

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**Departamento de Estomatología IV (Profilaxis, Odontopediatría y  
Ortodoncia)**



**TESIS DOCTORAL**

**Niveles de interleuquina 1 beta en el fluido crevicular gingival durante el  
movimiento dentario en el paciente ortodóncico adulto**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Gema López Paniagua**

**Directores**

**M<sup>a</sup> Concepción Martín Alvaro  
José Antonio Alarcón Pérez**

**Madrid, 2018**

# **Universidad Complutense de Madrid**

## **Facultad de Odontología**

**Departamento de Estomatología IV (Profilaxis, Odontopediatría y Ortodoncia)**



### **NIVELES DE INTERLEUQUINA 1 BETA EN EL FLUIDO CREVICULAR GINGIVAL DURANTE EL MOVIMIENTO DENTARIO EN EL PACIENTE ORTODÓNCICO ADULTO**

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por

Gema López Paniagua

Directores

Dra. M<sup>a</sup> Concepción Martín Álvaro

Dr. José Antonio Alarcón Pérez

Madrid, 2017

# **Universidad Complutense de Madrid**

## **Facultad de Odontología**

**Departamento de Estomatología IV (Profilaxis, Odontopediatría y Ortodoncia)**



### **NIVELES DE INTERLEUQUINA 1 BETA EN EL FLUIDO CREVICULAR GINGIVAL DURANTE EL MOVIMIENTO DENTARIO EN EL PACIENTE ORTODÓNCICO ADULTO**

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por

Gema López Paniagua

Directores

Dra. M<sup>a</sup> Concepción Martín Álvaro

Dr. José Antonio Alarcón Pérez

Madrid, 2017







**D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Concepción Martín Álvaro**, profesora contratada doctor de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid,

INFORMA,

Que el presente trabajo de investigación titulado “NIVELES DE INTERLEUQUINA 1  $\beta$  EN EL FLUIDO CREVICULAR GINGIVAL DURANTE EL MOVIMIENTO DENTARIO EN EL PACIENTE ORTODÓNCICO ADULTO” ha sido realizado bajo mi dirección por D<sup>a</sup>. Gema López Paniagua y reúne, en mi criterio, los requisitos y méritos suficientes para optar, mediante el mismo, al grado de Doctora en Odontología por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, 14 de Abril de 2017

Prof<sup>a</sup>. Dra. D.<sup>a</sup> María Concepción Martín Álvaro  
DIRECTORA DE TESIS



**D. José Antonio Alarcón Pérez**, profesor asociado de la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada,

INFORMA,

Que el presente trabajo de investigación titulado “NIVELES DE INTERLEUQUINA 1  $\beta$  EN EL FLUIDO CREVICULAR GINGIVAL DURANTE EL MOVIMIENTO DENTARIO EN EL PACIENTE ORTODÓNCICO ADULTO” ha sido realizado bajo mi dirección por D<sup>a</sup>. Gema López Paniagua y reúne, en mi criterio, los requisitos y méritos suficientes para optar, mediante el mismo, al grado de Doctora en Odontología por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, 14 de Abril de 2017

Prof. Dr. José Antonio Alarcón Pérez  
DIRECTOR DE TESIS





## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Martin por su buena disposición, siempre acompañada de una entrañable amabilidad, su inestimable tiempo y su apoyo. Porque no imagina el cariño y respeto que infunde con la calidez humana que le rodea.

Al Dr. Alarcón por sus maravillosos consejos y aportaciones, por su dedicación, sus ánimos, y por su gran generosidad al compartir todos su extraordinarios conocimientos científicos.

Mi mayor agradecimiento y admiración a ambos.

Al Dr. Miguel Padial por su aportación imprescindible, su grandísima colaboración y su entusiasmo contagioso hacia un mundo apenas conocido para mí como es la fase de laboratorio. A Cristina Puche por acompañarme en esta aventura de conocimiento.

Y por último a mi familia y amigos por ser grandes apoyos incondicionales en cada decisión tomada y camino elegido, gracias por vuestra ayuda y cariño en todo momento y siempre.





Índi  
re

<b>Resumen .....</b>	<b>13</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>16</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>20</b>
<b>I.1 Movimiento dentario: Estructuras biológicas.....</b>	<b>21</b>
I.1.1 Cemento .....	21
I.1.2 Ligamento periodontal.....	22
I.1.3. Hueso alveolar .....	23
<b>I.2 Remodelación ósea provocada por fuerzas ortodóncicas .....</b>	<b>28</b>
I.2.1 Fundamentos de los movimientos ortodóncicos .....	28
I.2.2 Origen de los osteoclastos en el movimiento ortodóncico.....	29
I.2.3 Mediadores bioquímicos del movimiento dentario.....	30
I.2.4 Acción de las fuerzas aplicadas ortodoncia.....	32
<b>I.3 Fluido crevicular.....</b>	<b>34</b>
I.3.1 Concepto .....	35
I.3.2 Cambios en el fluido crevicular relacionados con el.....	36
movimiento ortodóncico.....	36
<b>I.4 Interleuquina 1<math>\beta</math>.....</b>	<b>37</b>
I.4.1 Concepto de Interleuquina 1 $\beta$ .....	37
I.4.2 Función de la Interleuquina 1 $\beta$ .....	38
<b>I.5 Dolor relacionado con el movimiento dental ortodóncico.....</b>	<b>41</b>
<b>2. Justificación .....</b>	<b>44</b>
<b>3. Objetivos .....</b>	<b>46</b>
<b>4. Material y método.....</b>	<b>48</b>
<b>4.1 Selección de la población de estudio:.....</b>	<b>48</b>
<b>4.2 Diseño del estudio.....</b>	<b>49</b>
4.2.1 Movimiento ortodóncico.....	49
4.2.2 Visitas.....	50
4.2.3 Parámetros clínicos.....	50
4.2.4 Recogida del fluido crevicular gingival .....	52
4.2.5 Evaluación del disconfort o dolor .....	53
4.2.6 Análisis de la muestras .....	53
4.2.7 Análisis de los datos.....	65
<b>5. Resultados .....</b>	<b>67</b>
<b>5.1 Valores de IL 1<math>\beta</math>.....</b>	<b>67</b>
5.1.1 IL- 1 $\beta$ expresada en pg/30 segundos.....	67
5.1.2 IL- 1 $\beta$ expresada en pg/valor neto de periotrón .....	71
5.1.3 IL 1 $\beta$ expresada en pg/ $\mu$ l de periotrón .....	75
<b>5.2 Evaluación del disconfort o dolor.....</b>	<b>79</b>
<b>5.3 Relación entre los niveles de IL 1<math>\beta</math> en el fluido crevicular y la intensidad de dolor percibida.....</b>	<b>83</b>
<b>6. Discusión.....</b>	<b>86</b>
<b>6.1. Selección de la muestra .....</b>	<b>86</b>
<b>6.2 Selección de la Técnica .....</b>	<b>87</b>
<b>6.3 Análisis de los Resultados .....</b>	<b>88</b>
<b>7. Conclusiones.....</b>	<b>96</b>
<b>8. Bibliografía .....</b>	<b>98</b>
<b>Anexo .....</b>	<b>107</b>

An impressionistic painting of a harbor scene, likely by J.M.W. Turner. The painting features a large ship in the foreground, with other vessels and buildings visible in the background. The colors are vibrant and blended, creating a sense of movement and light. The overall composition is dynamic and captures a moment of maritime activity.

Resume  
n/

## Resumen

---

En el movimiento dentario se encuentra involucrado además del propio diente el tejido de soporte periodontal; en el fluido crevicular aparecen determinados factores bioquímicos relacionados con la reabsorción y la formación ósea durante el movimiento ortodóncico.

El objetivo de este estudio fue conocer los niveles de interleuquina IL 1 $\beta$  en el fluido crevicular para conocer el proceso inflamatorio que se produce durante el movimiento ortodóncico y saber si puede estar asociado o no al dolor que perciben los pacientes durante el tratamiento.

Fueron seleccionados 29 pacientes adultos (15 mujeres, con una edad media de  $21,8 \pm 1,2$  años y 14 hombres, con una edad media de  $21,2 \pm 1,5$  años) que iban a ser tratados ortodóncicamente mediante aparatología fija multibrackets. Se cementaron brackets (0.022 x 0.028 pulgadas, Mini Master, American Orthodontics, Sheboygan, WI, USA, técnica MBT) en la cara vestibular de los dientes experimentales, y un tubo de cementado directo en cada primer molar superior del mismo lado del diente experimental. Se aplicó una fuerza continua de 100 g por medio de un coil spring de níquel-titanio GAC Sentalloy 100gr Closed Coil Springs (GAC International Inc, Bohemia, NY, USA), y se tomaron muestras de fluido crevicular en mesial (tensión) y distal (compresión) del diente experimental, y en distal del diente control, durante varias visitas: justo antes de aplicar la fuerza, a las 24 horas posteriores, a los 7 y a los 28 días después.

Las muestras de fluido crevicular se tomaron con puntas de papel tipo Periopaper, el volumen de la muestra se midió por medio de un Periotrón 8000 (Harco) previamente calibrado.

El dolor se evaluó mediante una escala analógica visual (VAS) de 100 mm, con dos puntos finales, etiquetados como “no dolor” en la izquierda y “máximo dolor” en la derecha.

Los niveles de IL-1 $\beta$  del diente experimental y del diente control fueron analizados mediante un inmunoensayo Multiplex por citometría de flujo. Para el análisis estadístico se aplicó el test de Shapiro Wilks para comprobar la normalidad de la muestra. Las diferencias intra (visitas) e intergrupo (lados) se analizaron utilizando un test de Anova paramétrico de dos vías para medias repetidas con contrastes a posteriori de Bonferroni.

Se aplicó el coeficiente de correlación de Pearson para valorar la posible asociación entre los niveles de dolor en las distintas visitas y los valores de IL-1 $\beta$  para los distintos lados estudiados. Los análisis se llevaron a cabo con el paquete estadístico SPSS versión 22. El nivel de significación estadística se estableció en  $p \leq 0.05$  al 95%.

Nuestros datos muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los valores de IL-1 $\beta$  en el lado de compresión frente al lado de tensión y control a las 24 horas de iniciarse el movimiento dentario. Igualmente aparecen diferencias significativas en el dolor percibido espontáneamente y al masticar en el diente experimental a las 24 horas del movimiento y sólo al masticar a los 28 días frente al diente control y los valores basales. Existe además una correlación entre el dolor del diente experimental al morder el rollo de algodón con un aumento en los niveles de interleuquina 1 $\beta$  en lado de compresión de dicho diente.

Como conclusión podemos afirmar que existe un incremento en los niveles de IL-1 $\beta$  a las 24 horas de aplicar una fuerza ortodónica y una asociación positiva entre dichos niveles de IL-1 $\beta$  detectados en el lado de compresión y el dolor/discomfort percibido por el paciente.



## Abstract

---

Periodontal tissue is actively involved in dental movement besides the tooth itself; certain biochemical factors related to bone resorption and formation during orthodontic movement appear in the gingival crevicular fluid.

The aim of this study was to appraise the levels of interleukin IL-1 $\beta$  in the crevicular fluid in order to know the inflammatory process that occurs during orthodontic movement and to learn whether or not it may be associated with the pain perceived by patients during treatment.

Twenty-nine adult patients (15 women, with an average age of  $21.8 \pm 1.2$  years and 14 men, with an average age of  $21.2 \pm 1.5$  years) were selected to be treated orthodontically by fixed-devices multibrackets. Brackets (0.022 x 0.028 inches, Mini Master, American Orthodontics, Sheboygan, WI, USA, MBT technique) were cemented into the vestibular side of the experimental teeth. A direct cementing tube was cemented into the upper first molar on the same side of the experimental tooth. A 100 g continuous force was applied by means of a Nikon-Titanium coil spring GAC Sentalloy 100 g Closed Coil Springs (GAC International Inc, Bohemia, NY, USA). Crevicular fluid samples were collected in mesial (tension) and distal (compression) of the experimental tooth and distal of the control tooth prior to the application of the orthodontic force, 24 hours later, and 7 and 28 days after applying such force.

Crevicular fluid samples were taken with Periopaper paper tips, the volume of the sample was measured by means of a previously calibrated Periotron 8000 (Harco). Pain was assessed using a visual analogue scale (VAS) of 100 mm, with two extremes, labeled as "no pain" on the left end and "maximum pain" on the right end.

IL-1 $\beta$  levels of the experimental tooth and the control tooth were analyzed through a multiplex immunoassay by flow cytometry. For the statistical analysis the Shapiro Wilks test was applied to check the normality of the sample. Intra (visits) and intergroup (sides) differences were analyzed using a two-way parametric Anova test for repeated average-data with Bonferroni a posteriori contrasts.

Pearson's correlation coefficient was applied to estimate the possible association between pain levels at different visits and IL-1 $\beta$  values for the different sides considered. The assays were carried out with the statistical package SPSS version 22. The level of statistical significance was established in  $p \leq 0.05$  to 95%.

Our data have shown some significant differences ( $p < 0.05$ ) in the IL-1 $\beta$  values on the compression side versus the tension and control side 24 hours after the tooth movement has begun. Other significant differences also appeared in spontaneously perceived pain and chewing of the experimental tooth 24 hours after the movement and only on chewing after 28 days versus control tooth and baseline values. There is also a correlation between experimental tooth pain when biting the cotton roll with an increase of the interleukin 1 $\beta$  levels on the compression side of the tooth.

As a conclusion, we can affirm that there is an increase in IL-1 $\beta$  levels within 24 hours of applying an orthodontic force and a positive association between the levels of IL-1 $\beta$  detected on the compression side and the pain / discomfort perceived by the patient.

An abstract painting featuring vertical stripes of various colors including blue, green, red, and white, with a textured, brushstroked appearance. The colors are layered and blended, creating a sense of depth and movement.

# Introdu cción

# 1. Introducción

---

Desde que en 1951 Kaare Reitan y en 1973 Per Rygh publicaran sus respectivos artículos sobre el análisis histológico de los tejidos periodontales en respuesta al tratamiento ortodóncico, este campo de estudio sigue muy vigente [1].

En el movimiento dentario se encuentra involucrado además del propio diente el tejido de soporte periodontal; cuando realizamos un tratamiento de ortodoncia se produce un proceso de remodelación ósea en el que intervienen determinados factores bioquímicos relacionados con la reabsorción y la formación ósea.

Dentro de los factores bioquímicos, se ha visto que IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , sustancia P ó NTx están asociados a la reabsorción ósea mientras que otros factores como osteocalcina o leptina aparecen asociados a la formación ósea [2, 3]. Por ello su estudio durante el movimiento dentario nos puede resultar útil a la hora de conocer mejor el mecanismo y proceso biológico al que se someten todos los tejidos cuando estamos realizando un tratamiento ortodóncico.

El objetivo de este estudio es por tanto conocer los niveles de interleuquina IL 1 $\beta$  en el fluido crevicular para conocer el proceso inflamatorio que se produce durante el movimiento ortodóncico y saber si puede estar asociado o no al dolor que perciben los pacientes durante el tratamiento.

## I.1 Movimiento dentario: Estructuras biológicas

En el movimiento dentario se encuentran involucrados tanto el diente como el periodonto de inserción compuesto a su vez por tres estructuras que conforman una unidad funcional y comparten el mismo origen embriológico: cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar. Los tres se originan, al mismo tiempo que se forma la raíz del diente, a partir de la capa celular interna del saco dentario [3].

### I.1.1 Cemento

Es un tejido conectivo mineralizado, derivado de la capa celular ectomesenquimática del saco o folículo dentario. El cemento cubre la dentina en la porción radicular y su función principal es anclar las fibras del ligamento periodontal a la raíz del diente.

Al contrario que el hueso alveolar no tiene capacidad de ser remodelado y es por lo general más resistente a la reabsorción que el hueso y esto permite la aplicación de técnicas ortodóncicas.

El cemento está formado por elementos celulares, cementoblastos y cementocitos, y por una matriz extracelular calcificada. En ocasiones pueden hallarse cementoclastos u odontoclastos, los cuales tienen capacidad de reabsorción de tejidos duros, pudiendo aparecer en algunas patologías, durante la reabsorción radicular de dientes temporales o en caso de excesivo movimiento dental con aparatología fija.

### I.1.2 Ligamento periodontal

Es una delgada capa de tejido conectivo fibroso, que por medio de sus fibras une al diente con el hueso alveolar que lo aloja.

Presenta una alta densidad celular, en su mayoría fibroblastos que representan un 20%, osteoblastos, cementoblastos, osteoclastos, cementoclastos, macrófagos, mastocitos, eosinófilos, células epiteliales de Malassez y células madres ectomesenquimáticas.

Los fibroblastos del ligamento periodontal son los encargados de remodelar los haces de fibras colágenas del ligamento durante los movimiento fisiológicos u ortodóncicos.

El fibroblasto del ligamento periodontal presenta, entre otros, dos receptores de superficie muy característicos: el EFG (factor de crecimiento epidérmico) y la IL-1 (interleukina 1). El incremento de IL-1 estimula la actividad sintética del fibroblasto que entre otros productos produce colagenasa e IL-6. Esta última sustancia estimula de manera significativa la actividad osteoclástica, siendo una respuesta importante ante fuerzas ortodoncias.

Además los fibroblastos sintetizan la proteína ligadora del calcio S100-A4 que es uno de los componentes responsables de inhibir la mineralización en el espacio extracelular del ligamento periodontal.

En el ligamento periodontal encontramos también distintos tipos de fibras colágena (tipo III, tipo V y tipo I la más abundante), reticulares, elásticas, oxitalánicas y de elaunina. Y por último una sustancia fundamental o matriz amorfa con una elevada proporción de proteoglicanos (como el ácido hialurónico,

condroitín 4-sulfato, condroitón 6-sulfato, dermatán sulfato y heparán sulfato) y glicoproteínas adhesivas como ondulina, tenascina y fibronectina.

En el ligamento periodontal se forma una rica red de arteriolas y capilares, así como anastomosis arteriovenosas y vasos linfáticos, la innervación sensorial a través de mecanorreceptores capaces de identificar mínimas fuerzas que se le apliquen a los dientes proviene de los nervios maxilar y dentario inferior, respectivamente [3].

### I.1.1.3. Hueso alveolar

El tejido óseo es una variedad de tejido conectivo, es un tejido dinámico y está constituido por células y matriz extracelular. Su composición es la siguiente, aproximadamente el 10% son células, el 60% son cristales minerales (hidroxiapatita cristalina) y el 30% una matriz orgánica.

Alrededor del 90% de la matriz orgánica está compuesta por colágeno tipo I. Aunque su composición también contiene pequeñas proporciones de colágeno tipo III y IV, el 10% restante está constituido por sustancias no colágenas: glicoproteínas, fosfoproteínas, proteoglicanos, enzimas (fosfatasa alcalina, collagenasa), productos extravasados de la sangre y factores de crecimiento (TGF $\beta$ , FGF, etc.)

Las células funcionan coordinadamente sintetizando, manteniendo y remodelando el tejido óseo [3]. Dentro del grupo celular tenemos:

#### 1. Células osteoprogenitoras:

- Preosteoblastos, que proceden de células mesenquimáticas indiferenciadas y se localizan en el tejido conectivo del periostio,



endostio y tejido conectivo perivascular. Dan origen a osteoblastos y osteocitos.

- Preosteoclastos, que derivan de los monocitos y macrófagos y son los precursores de los osteoclastos.

2. Osteoblastos: encargados de la síntesis, secreción y mineralización de la matriz orgánica. En las zonas con actividad osteogénica se encuentran separados de la matriz ósea calcificada por una zona de matriz no mineralizada denominada sustancia osteoide.

3. Osteocitos: a medida que los osteoblastos van secretando la sustancia osteoide, la cual luego se calcifica, algunos quedan encerrados dentro de la misma y se transforman en osteocitos. Las cavidades que alojan se denominan osteoplastos.

4. Osteoclastos: son las células encargadas de producir la reabsorción ósea, se consideran integrantes del sistema fagocítico mononuclear. Entre las propiedades más características de los osteoclastos destacan la existencia de receptores de calcitonina y la presencia significativa de anhidrasa carbónica en las microvellosidades del ribete en el reborde externo de la superficie de reabsorción.

5. Célula bordeante ósea o de revestimiento: son células que revisten la matriz ósea en aquellos lugares en los que ni se forma ni se destruye hueso. Se originan a partir de un osteoblasto, según algunos autores en determinadas circunstancias podrían volver al ciclo y diferenciarse en osteoblastos [4, 5].

#### I.1.3.1 Estructura anatómica del hueso alveolar

Los bordes alveolares son una extensión del cuerpo óseo del maxilar y la mandíbula, siguen la curvatura de los arcos dentarios y forman unas cavidades

cónicas llamados alveolos dentarios que alojan las raíces de los dientes. En un corte vestibulolingual, la vertiente libre se denomina cortical perióstica (está formada por hueso compacto y revestida por periostio) y la vertiente alveolar se denomina cortical periodóntica (al estar relacionada con el ligamento periodontal). En el centro suele haber tejido óseo medular, trabecular o esponjoso, excepto en las crestas alveolares en donde ambas corticales están en contacto [3].

La función primordial del hueso alveolar es proporcionar un soporte para que los dientes se alojen y se fijen por medio de las fibras periodontales, constituyendo una articulación alveolodentaria, que permite resistir las fuerzas generadas durante la masticación, fonación y deglución.

El hueso alveolar también participa de otras actividades propias del tejido óseo: es un reservorio de calcio y está implicando en los mecanismos de regulación de la calcemia, a través de los intercambios en el sistema canalículolacunar [4].

#### I.1.3.2 Formación y remodelación del tejido óseo

En los humanos la formación ósea ocurre generalmente por remodelación. La remodelación ósea es un proceso fisiológico en el cuál el hueso viejo o dañado es eliminado por los osteoclastos y reemplazado por un hueso nuevo formado por los osteoblastos. La reabsorción ósea y la aposición ósea no se producen a lo largo de la superficie del hueso de forma aleatoria, por el contrario, se produce en determinados sitios anatómicos y sigue una secuencia de acontecimientos bien definida, que se conoce como el ciclo de remodelado [6].

La remodelación ósea requiere la acción coordinada de las principales células óseas: células de revestimiento óseo, osteocitos, osteoclastos y osteoblastos [5, 7].

Los procesos de remodelación ósea implican 4 grandes fases distintas pero que se superponen :

- Fase 1: iniciación/activación de la remodelación ósea en un sitio específico.
- Fase 2: reabsorción ósea y reclutamiento simultáneo de células madre mesenquimales y osteoprogenitoras.
- Fase 3: diferenciación osteoblástica y síntesis de osteoide.
- Fase 4: mineralización de osteoide y terminación de la remodelación ósea.

Los osteocitos tienen varias características que los hacen los principales candidatos para ser los elementos mecanorreceptores en el hueso, están bañados de un líquido pericanalicular que está en un espacio reducido y por lo tanto es susceptible a cambios ligeros en el flujo provocado por las perturbaciones mecánicas; además están conectados unos a otros, y a osteoblastos a través de uniones de baja resistencia que facilitan la transmisión de señales por todo el tejido [7].

Las hormonas calciotropas son los reguladores fisiológicos más importantes de la homeostasis del calcio por su acción directa sobre osteoblastos y osteoclastos.

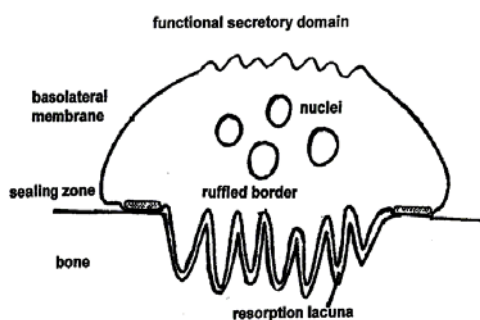
Actualmente existen evidencias que muestran que tanto la calcitonina como la paratohormona poseen efectos anabólicos y catabólicos potenciales en el hueso y se han reconocido varios mecanismos moleculares y celulares involucrados en este proceso [8, 9].

Los osteoclastos tienen un papel muy importante en el proceso de remodelación ósea ya que son células responsables de la reabsorción ósea. La diferenciación de los osteoclastos implica varios pasos importantes: células madre hematopoyéticas dan lugar a unidades formadoras de colonias de granulocitos/macrófagos, las cuales además se diferencian en células de la línea de monocitos/macrófagos en la

médula ósea. Las células mononucleadas de la línea de monocitos/macrófagos en la médula ósea son atraídas a los posibles sitios de reabsorción y entonces se unen a la matriz ósea para diferenciarse en osteoclastos en respuesta al factor estimulante de colonias de monocitos/macrófagos (M-CSF) y al receptor activador del ligando NF- $\kappa$ B (RANKL) [5, 10].

Los osteoclastos liberan ácidos orgánicos y enzimas hidrolíticas causando degradación (de la hidroxiapatita cristalina y de la matriz ósea orgánica), osteólisis y formando unas cavidades que se conocen como lagunas de Howship. Al iniciar la reabsorción ósea, los osteoclastos se polarizan, el citoesqueleto se somete a una profunda reorganización y aparecen tres dominios de membrana distintos: un borde de volantes, una zona de sellado y un dominio de secreción funcional (Imagen 1). Este proceso está influenciado por factores generales, como la paratohormona, la calcitonina y la vitamina D<sub>3</sub> así como por factores locales como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$ , PGE<sub>2</sub> ó PDGF, ya que cada osteoclasto posee varios millones de receptores para tal fin [5, 11, 12].

Cuando los osteoclastos se retiran, esas lagunas de Howship son invadidas por osteoblastos completándose el remodelado óseo (reabsorción-remodelación).



**Imagen 1.** Esquema de osteoclasto obtenido del libro “Histología y embriología bucodental” M.Gómez de Ferraris.

## I.2 Remodelación ósea provocada por fuerzas ortodóncicas

Los tratamientos ortodóncicos se aprovechan de la importante plasticidad que ofrece el hueso alveolar. El movimiento dentario ortodóncico se produce como una respuesta biológica de los tejidos a determinadas fuerzas mecánicas a las que se les someten. Estas fuerzas inician, promueven y mantienen una remodelación de los tejidos dentales y paradentales, facilitando el movimiento de los dientes a las nuevas posiciones [13].

### I.2.1 Fundamentos de los movimientos ortodóncicos

El movimiento en ortodoncia se produce por los procesos explicados con anterioridad de reabsorción-reposición.

Al comienzo del movimiento ortodóncico del diente, el estímulo mecánico provoca una reacción inflamatoria aguda dentro de los tejidos periodontales. Esta fase se caracteriza por vasodilatación periodontal y migración de leucocitos fuera de los capilares del ligamento periodontal. Los primeros procesos reconocidos y descritos fueron una serie de cambios vasculares y celulares, además de un gran número de mediadores inflamatorios, factores de crecimiento y neuropéptidos en los tejidos de soporte periodontal. El incremento de sus niveles durante el movimiento dental ortodóncico ha permitido la suposición de que interacciones entre células productoras de esas sustancias, así como células del sistema nervioso, inmune y endocrino, regulan las respuestas biológicas seguidas a la

aplicación de fuerzas ortodóncicas [14]. De acuerdo con esto se producen unos procesos biológicos que dan lugar a la reabsorción ósea para acomodar el diente.

El mecanismo de reabsorción ósea por tanto, induce la liberación de mediadores inflamatorios a nivel biomolecular, como la IL-1. La interleuquina 1 existe en dos formas, alfa y beta. Ambas inducen reabsorción pero parece ser que la IL-1  $\beta$  es un inductor más potente de la reabsorción e inhibe la formación ósea [14, 15].

Por el contrario en el lado opuesto se generaran una serie de fuerzas tensionales que conlleva a la activación de procesos que desencadenan la formación y aposición ósea. Esta remodelación involucra, tanto a las trabéculas, como a las compactas alveolares. De esta forma se logra que el alveolo que aloja el diente sufra un desplazamiento, con lo cual no se altera la relación respecto al hueso alveolar [10].

La velocidad del movimiento dentario depende por tanto de la velocidad de la reabsorción ósea, para ello las fuerzas ortodóncicas deben convertirse en señales inter e intracelulares por las células mecanorreceptoras produciéndose una respuesta coordinada de reabsorción y aposición ósea [16].

### I.2.2 Origen de los osteoclastos en el movimiento ortodóncico

La osteoclastogénesis en el movimiento dental ortodóncico es iniciada por dos cambios relacionados con la aplicación de la fuerza: el daño del tejido, con la subsecuente producción de un proceso inflamatorio en el ligamento periodontal y la deformación del proceso alveolar. La fusión y diferenciación de osteoclastos es

un proceso complejo que está influido por varias citoquinas y factores de crecimiento. Tanto osteoclastos como células progenitoras de los osteoclastos aparecen en sitios de compresión después de que las fuerzas sean aplicadas. La inducción de los osteoclastos, representada por pre-osteoclastos mononucleares, primero ocurre en los espacios vasculares y medulares de la cresta alveolar, seguido de incrementos en el espacio del ligamento periodontal [7].

### I.2.3 Mediadores bioquímicos del movimiento dentario

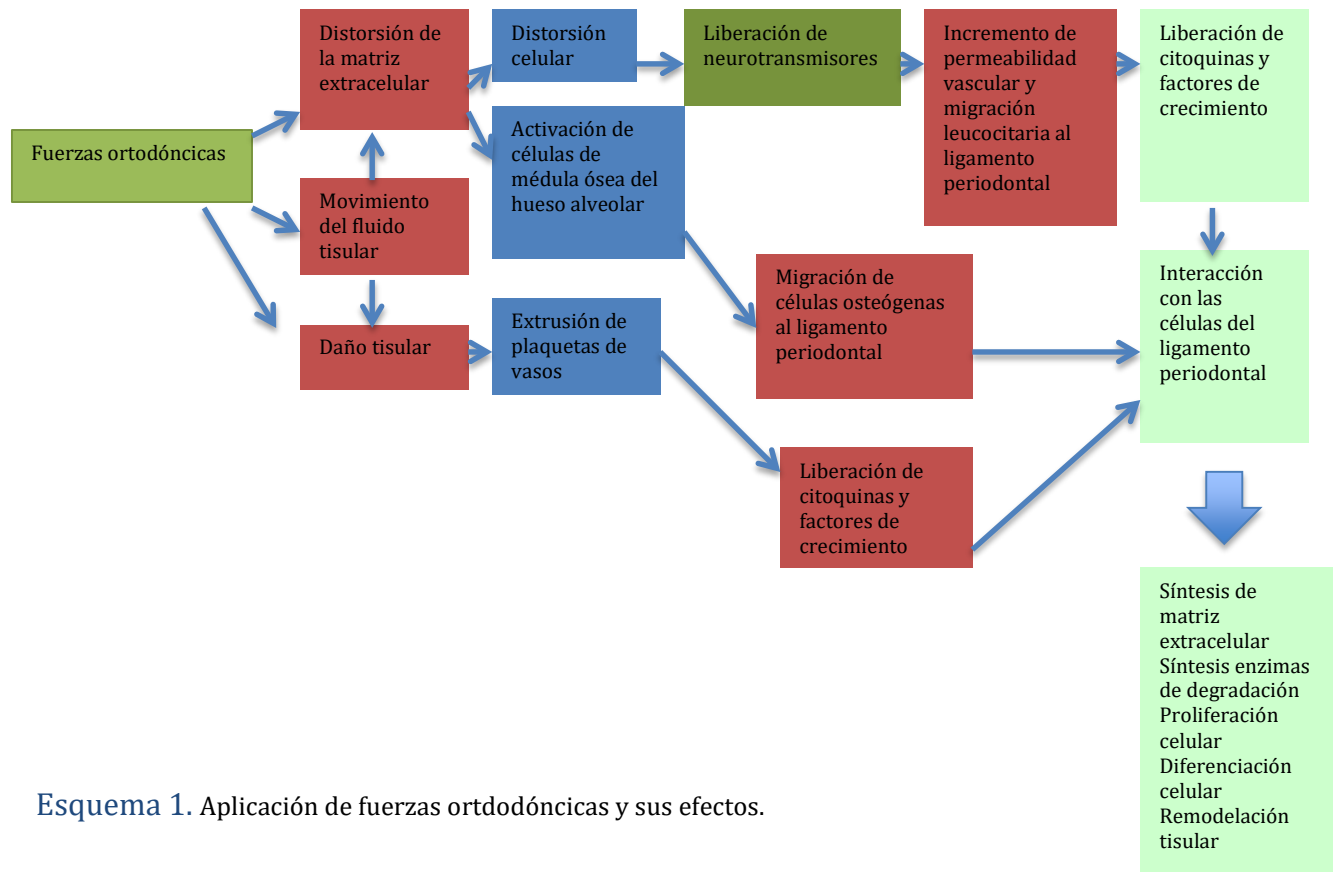
A lo largo de la historia, mediante el uso de técnicas microscópicas se ha averiguado qué elementos influyen en el mecanismo de remodelación que acompaña al movimiento dentario. Actualmente, mediante el uso de técnicas más sofisticadas como la inmunohistoquímica, el inmunoensayo y la microscopía electrónica, puede avanzarse más allá en el complejo proceso del movimiento dentario, esclareciéndose cómo la fuerza que aplicamos se transforma en un proceso orgánico y cómo se comunican entre sí las células que intervienen en dicho proceso de remodelación. Estos procesos, aún hoy día no son enteramente comprendidos. El proceso es muy complejo e influyen en él multitud de factores bioquímicos (Tabla 1).

HORMONAS	<p>Polipéptidos</p> <p>Hormona paratiroideas</p> <p>Calcitonina</p> <p>Insulina</p> <p>Hormona del crecimiento</p> <p>Corticoesteroides</p> <p>1,25, dihidroxi Vitamina D3</p> <p>Glucocorticoides</p> <p>Hormonas sexuales</p>
FACTORES DE CRECIMIENTO	<p>Factor de crecimiento “insulin-like” I y II</p> <p>Factor de crecimiento Beta</p> <p>Factor de proliferación de fibroblastos</p> <p>Factor de crecimiento derivado de las plaquetas</p> <p>Factores de crecimiento del tejido conectivo</p>
CITOQUINAS	<p>Interleuquina 1</p> <p>Interleuquina 6</p> <p>Interleuquina 11</p> <p>Factor de necrosis tumoral</p> <p>Factor de diferenciación osteoclástico</p> <p>Interleuquina 4</p> <p>Interleuquina 13</p> <p>Interleuquina 18</p> <p>Interferón gamma</p> <p>Osteoprotegerina</p> <p>RANK/RANKL (receptor activador de NF-<math>\kappa</math>B )</p>
FACTORES ESTIMULADORES DE COLONIAS	<p>M-CSF</p> <p>G-CSF</p> <p>GM-CSF</p>
OTROS	<p>Leucotrienos</p> <p>Óxido nítrico</p>

**Tabla 1.** Tabla de mediadores bioquímicos involucrados en el movimiento dentario.



### I.2.4 Acción de las fuerzas aplicadas ortodoncia



Esquema 1. Aplicación de fuerzas ortodóncicas y sus efectos.

En la mayoría de los casos, el resultado del tratamiento de ortodoncia es predecible, siempre que los sistemas de fuerzas aplicados sean mecánicamente correctos y las raíces de los dientes se muevan dentro de las limitaciones de sus tejidos circundantes. Sin embargo, es complicado garantizar un resultado exitoso, en el cuál no aparezcan efectos adversos cuando estos criterios no sean aplicados.

Para evitar la aparición de efectos adversos en ortodoncia, los ortodoncistas deben poseer un conocimiento excelente, complejo y actual en la mecánica, fisiología y biología de los movimientos ortodóncicos [13].

Actualmente estudios como el de Tatako NaKano de 2014, ponen de manifiesto la importancia de la fuerza aplicada y el tipo de movimiento ya sea de inclinación o de gresión a la hora de que se produzcan reabsorciones radiculares. En este estudio experimental en ratas se concluyó que las reabsorciones radiculares aumentan cuando se aumenta la fuerza aplicada y se multiplican en caso de que el movimiento que se genere sea de inclinación en lugar de gresión [17].

Por tanto hay una fuerza ideal que mueve cada tipo de diente a una velocidad óptima, debido a las diferencias en la superficie de la raíz. Diversas variables, como magnitud, dirección, distribución y duración de la fuerza, tensión o cambios biológicos en el ligamento periodontal deberían ser considerados para obtener movimientos dentales óptimos.

El movimiento dental inicial debería efectuarse con fuerzas ligeras. Fuerzas elevadas tienden a incrementar la cantidad y la velocidad del movimiento, pero se producen efectos secundarios clínicos indeseables como reabsorción de la raíz. Fuerzas ligeras producen mejores movimientos dentales (en términos de control biológico y ventaja mecánica) y menos reabsorción de la raíz que fuerzas elevadas [18].

La reabsorción de la raíz es una complicación común asociada al tratamiento de ortodoncia. Este efecto secundario indeseable ha sido descrito como el resultado de un proceso inflamatorio complejo que envuelve varios componentes dispares incluyendo las fuerzas mecánicas, los tejidos óseos y de la raíz del diente, las células de alrededor de la matriz y determinados mensajeros biológicos.

La aplicación de fuerzas ortodóncicas induce un proceso local que incluye todas las características de la inflamación (rojez, calor, hinchazón, dolor y función alterada).

El proceso inflamatorio, una característica esencial del movimiento dental, es

actualmente el componente fundamental responsable del proceso de reabsorción de la raíz. Este proceso de reabsorción requiere interacciones específicas entre varias células inflamatorias y tejidos duros, como el hueso, el cemento o la dentina y es un proceso de múltiples pasos. Por ello es importante conocer con mayor exactitud los procesos inflamatorios que se producen a nivel local. La investigación de los factores de riesgo asociados con el desarrollo de la reabsorción de la raíz durante el tratamiento ortodóncico sugiere que la susceptibilidad individual, factores sistémicos y genéticos pueden ser moduladores significativos de este proceso [14].

La presencia de reabsorción de la raíz antes de comenzar el tratamiento es normalmente considerado un factor predisponente fuerte para presentar reabsorción de la raíz durante el tratamiento [19]. La reabsorción de la raíz tiene una importancia clínica limitada para el paciente promedio. Sin embargo, para el paciente susceptible, la reabsorción de la raíz podría limitar los resultados de un tratamiento ortodóncico exitoso [20].

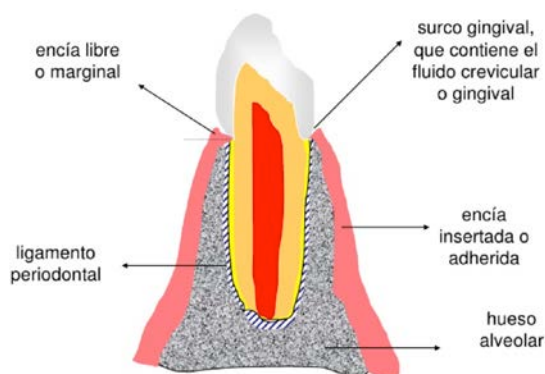
### I.3 Fluido crevicular

En 1958 Brill y Krasse descubrieron la presencia de un líquido fisiológico que se localizaba en la parte gingival del diente y no era saliva. Este fluido, denominado fluido gingival crevicular (GCF en inglés, “gingival crevicular fluid”), despertó rápidamente el interés de los investigadores que comenzaron a estudiar e investigar sobre la nueva información que podría proporcionar [21].

### I.3.1 Concepto

El fluido gingival crevicular es el trasudado o exudado inflamatorio que fluye por el surco gingival [20]. Ejerce un efecto de limpieza y protección de la unión dentogingival. Este fluido pasa desde el tejido conectivo al surco gingival a través del epitelio de unión.

El surco gingival se define como el espacio formado por la parte interna de la encía marginal y la superficie del diente. Este surco posee una pared externa (epitelio del surco), una pared interna (superficie dental) y un fondo o vértice (epitelio de unión, imagen 2).



**Imagen 2.** Surco gingival del diente, ilustración tomada de “Técnica de ayuda odontológica y estomatológica” J.Morillo

La composición del fluido gingival crevicular varía de acuerdo a las condiciones del tejido periodontal. El suero es la principal fuente del componente acuoso del fluido crevicular [14]. Su tasa de flujo está relacionada con el grado de inflamación gingival, en casos de mínima inflamación oscila en 0,05 a 0,20  $\mu$ l por minuto. El flujo total de fluido está entre 0,5 y 2,4 ml por día. Estudios recientes en movimientos dentales ortodónticos han utilizado el GCF debido a su naturaleza no

invasiva y facilidad de muestreo repetitivo en el mismo sitio con la ayuda de tiras de papel de filtro [16, 21-27].

El fluido gingival crevicular es conocido por contener una serie de factores celulares y bioquímicos que reflejan el estado del periodonto subyacente [28], comprende enzimas, subproductos metabólicos, proteínas del suero y otras sustancias relacionadas con el metabolismo del hueso alveolar. Los niveles de fluido crevicular pueden representar las condiciones biológicas del hueso [29].

### 1.3.2 Cambios en el fluido crevicular relacionados con el movimiento ortodóncico

La aplicación de fuerzas mecánicas desplaza el diente e induce una reacción inflamatoria por la compresión del ligamento periodontal. Como resultado se producen una amplia variedad de sustancias dentro del espacio periodontal que se difunden al fluido crevicular [30]. Para empezar, las propias fuerzas ortodóncicas pueden tener un efecto inmediato en los vasos sanguíneos resultando en un flujo aumentado del fluido crevicular [22].

La investigación indica que el volumen del fluido crevicular gingival se incrementa durante el tratamiento ortodóncico y que éste no es sólo en relación a los niveles de placa bacteriana, inflamación gingival, o profundidad de sondaje, sino también a la cantidad de movimiento dental [31].

Dudic y cols. en 2006 realizaron un estudio en el cual obtuvieron unos resultados que indicaban que durante el movimiento ortodóncico existe una liberación en el

fluido crevicular de mediadores bioquímicos como la PGE2, IL-1 $\beta$  y sustancia P [22]. Estudios como éste ponen de manifiesto la necesidad de conocer mejor los cambios que se producen a nivel del fluido crevicular ante las distintas fuerzas que aplicamos en ortodoncia.

## I.4 Interleuquina 1 $\beta$

### I.4.1 Concepto de Interleuquina 1 $\beta$

La IL-1 es una citoquina. Las citoquinas son polipéptidos o glucoproteínas extracelulares, hidrosolubles. Las citocinas influyen en la actividad, la diferenciación, la proliferación y la supervivencia de la célula inmunológica, como también regulan la producción y la actividad de otras citoquinas, que pueden aumentar (proinflamatorias) o atenuar (antiinflamatorias) la respuesta inflamatoria dependiendo del microambiente en que se encuentran. Entre las consideradas proinflamatorias, tenemos IL 1, 2, 6, 7 y TNF  $\alpha$ . Las antiinflamatorias son IL 4, 10 y 13.

La IL-1 $\beta$  representa uno de los mediadores más importantes de la inflamación. Se produce en grandes cantidades como respuesta a infecciones o cualquier tipo de lesión o estrés. Está sintetizada como una proteína precursora (Pro-IL-1 $\beta$ ), que no es segregada en la forma activa hasta ser metabolizada por la enzima caspasa-1 y posteriormente se libera en el medio extracelular.

Ha sido una de las primeras citoquinas descubierta en 1979 y está codificada por el cromosoma 2 [32, 33].

### I.4.2 Función de la Interleuquina 1 $\beta$

La IL-1 $\beta$  tiene un papel importante en diferentes procesos biológicos, incluyendo la síntesis de prostaglandina E2, la estimulación de la colagenasa y la inhibición de la formación ósea.

Las citoquinas son secretadas por varias células implicadas en la respuesta inmune como respuesta a un estímulo y actúan sobre las células diana que expresan en su membrana receptores específicos para cada citoquina dada. La unión de una citoquina a su receptor de membrana transmite una señal hacia el interior celular que conduce a cambios en la activación y expresión de genes. Además, en el suero se han detectado receptores solubles para las distintas citoquinas cuya acción es contribuir a la regulación de la actividad de las mismas.

Las citoquinas pueden actuar sobre muchos objetivos celulares diferentes, con una acción: a) autocrina, uniéndose a la misma célula que la secreta; b) paracrina, actuando sobre una célula cercana ó c) en algunas ocasiones, con una acción endocrina, uniéndose a células distantes. Diferentes tipos de células segregan la misma citocina, y una única citocina puede actuar en diversos tipos de células, fenómeno denominado pleiotropía.

La IL-1 $\beta$  es producida principalmente por células del linaje monocítico, incluyendo monocitos, macrófagos y células dendríticas. La producción y liberación de IL-1 $\beta$  se debe a una amplia variedad de estímulos, que pueden dividirse en moléculas de patrón molecular asociadas a patógenos (PAMPs) y moléculas de patrón molecular asociadas a daños (DAMPs). Los microorganismos invasores son reconocidos a través de PAMPs, tales como lipopolisacáridos (LPS), ácido lipoteicoico o flagelina.

Los DAMPs, tales como ATP, cristales de ácido úrico o proteínas S100, son ligandos endógenos liberados por células dañadas [34]. El reconocimiento de PAMPs y DAMPs se logra mediante la activación de receptores tipo toll (TLRs) asociados a membranas o receptores de tipo nucleótido citosólico y oligomerización (NLR). Así, tanto las moléculas de PAMP como las de DAMP pueden contribuir simultáneamente a la inducción de la liberación de IL-1 $\beta$  [32].

Pruebas experimentales demuestran que el tratamiento en serie de las células con LPS y ATP proporciona un estímulo muy potente para inducir la liberación rápida y eficiente de IL-1 $\beta$  a partir de monocitos, macrófagos y células dendríticas [35].

Cuando se aplica una fuerza ortodóncica a un diente durante un período prolongado de tiempo, se inicia una respuesta inflamatoria, al liberarse dichos endógenos por las células dañadas comienza un proceso de reabsorción ósea que acomoda el movimiento dentario. La aparición de los osteoclastos y la reabsorción ósea son factores críticos que inician el movimiento de los dientes. Las células osteoprogenitoras mononucleares en los tejidos locales requieren varias etapas de desarrollo para convertirse en osteoclastos multinucleados funcionales. Diversas citoquinas entre ellas la IL-1 $\beta$  así como diversas hormonas juegan un papel importante en este proceso.

La IL-1 $\beta$  inicia el proceso de reabsorción ósea al participar en la supervivencia, fusión y activación de los osteoclastos [27, 36]. Es secretada principalmente por monocitos y parcialmente por macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y células epidérmicas. En un modelo de gato, Davidovitch y cols. localizaron niveles inducidos de IL-1 y TNF- $\alpha$  en el periodonto de los dientes en movimiento [37].



La IL-1 también afecta directamente al metabolismo óseo. A concentraciones extremadamente bajas, está implicada en el proceso de remodelación ósea a través de receptores específicos en la población de células óseas [12, 38, 39]. Los monocitos y los macrófagos no producen continuamente IL-1, sin embargo su activación desencadena síntesis y liberación de esta citoquina.

Lynch y cols. demostraron que en las primeras etapas del movimiento dental (a las 12 y 24 horas) aparecen citoquinas en el ligamento periodontal. Como resultado de la fuerza que se aplica al diente, se produce una zona de presión en el ligamento periodontal iniciándose el proceso de resorción ósea e induciendo niveles de IL-1 en el fluido crevicular gingival [40].

A nivel sistémico además de su papel beneficioso en la mediación de las respuestas del huésped a la invasión microbiana, la IL-1 $\beta$  también puede tener efectos perjudiciales. El aumento en su producción se ha relacionado con una amplia variedad de enfermedades, en pacientes con infecciones virales, bacterianas, fúngicas o parasitarias, aterosclerosis, diabetes tipo 2 y diversos trastornos autoinmunes, como la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple y la enfermedad de Crohn. Las enfermedades neurodegenerativas que se acompañan de procesos inflamatorios, como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson, también se han caracterizado por la producción aumentada de IL-1 $\beta$  [41-45]. Algunos autores aseguran que además puede facilitar la invasión tumoral [44] y promueve el daño tisular en la patogénesis de enfermedades inflamatorias crónicas. Se encontró que el bloqueo de los receptores de IL-1 $\beta$  con antagonistas de los receptores IL-1 $\beta$  sintéticos reduce la gravedad de la artritis juvenil de inicio sistémico, la pancreatitis aguda y varios trastornos autoinflamatorios, incluyendo

la enfermedad de Still, la artritis lúpica, la osteoartritis y la espondilitis anquilosante [46, 47].

## I.5 Dolor relacionado con el movimiento dental ortodóncico

Uno de los inconvenientes que más preocupa a los pacientes antes de comenzar un tratamiento de ortodoncia es si va a ser doloroso. La prevalencia del dolor durante el tratamiento ortodóncico con aparatología fija es elevada. El dolor alcanza su intensidad máxima a las 24 horas después de aplicar la fuerza ortodóncica. Por tanto, el manejo del dolor en su intensidad máxima es de importancia clínica primordial.

Las molestias asociadas con el movimiento dental ortodóncico pueden ser consecuencia de la presión, la isquemia de los tejidos, la inflamación y el edema del ligamento periodontal, pero no se conocen con exactitud los mecanismos íntimos implicados [48]. Lo que sí se ha concluido en un meta-análisis realizado por Sandhu y colaboradores [49] es que los analgésicos y en especial el etoricoxib son eficaces y efectivos a la hora de controlar el dolor dental asociado al tratamiento ortodóncico. La selección de diferentes fármacos analgésicos en función de su vida media plasmática así como el uso del láser superpulsado tiene una evidencia clínica en el control del dolor dental. No obstante el dolor asociado con el tratamiento dental es una reacción subjetiva fuertemente influenciada por factores como el sexo, la personalidad y especialmente la experiencia general y dental previa al dolor que debe también tenerse en cuenta. Además, la experiencia

dolorosa está influenciada tanto por factores emocionales como medioambientales, incluyendo la cultura, la edad o el estrés [30].



Justifi  
cación

## 2. Justificación

---

La IL-1 $\beta$  tiene un papel fundamental en la respuesta del tejido óseo ante la aplicación de una fuerza y es secretada bajo condiciones de incremento de la reabsorción ósea [21] pero hasta donde nuestro conocimiento alcanza, los niveles de IL-1 $\beta$  no han sido explorados diferenciando el lado de tensión vs presión durante el movimiento dental ortodóncico.

El análisis de los componentes del fluido crevicular gingival es un método no invasivo para estudiar la respuesta celular del ligamento periodontal durante el movimiento dental ortodóncico [30]. Además el análisis de los componentes quizás nos proporcione una serie de indicadores bioquímicos cuantitativos para evaluar el metabolismo celular local, reflejando el estado de salud periodontal y el proceso de remodelación ósea durante el movimiento dental ortodóncico.

En el contexto que nos ocupa, es decir el movimiento dentario generado por aparatología ortodóncia fija multibrackets, el estudio del fluido puede ayudarnos a profundizar en los mecanismos que se producen y median, abrirnos nuevas vías diagnósticas y ayudarnos a aclarar algunos fenómenos a nivel bioquímico.

A nivel clínico también resulta de gran interés conocer mejor las bases del dolor que experimenta el paciente durante el tratamiento.

Por todo ello hemos planteado este estudio para comprobar el papel de la IL-1 $\beta$  tras la aplicación de fuerzas ortodóncicas para generar movimientos dentarios.

An abstract painting featuring vertical stripes of various colors including blue, green, red, and white, with a textured, painterly appearance. The colors are layered and blended, creating a sense of depth and movement.

Objeti

### 3. Objetivos

---

En el presente trabajo nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Determinar si la IL-1 $\beta$  puede detectarse en el fluido crevicular gingival y evaluar los cambios producidos en sus niveles en los lados de tensión y compresión durante los estadios iniciales del movimiento dentario ortodónico con aparatología fija en pacientes adultos.
2. Evaluar si hay diferencias en los resultados entre tres métodos diferentes de cuantificación de la IL-1 $\beta$  en fluido crevicular gingival: pg en función del tiempo de recogida de muestra, pg en función del volumen neto de muestra registrado por Periotrón y pg por  $\mu$ l del volumen registrado por Periotrón.
3. Analizar los niveles de dolor percibidos por el paciente durante los estadios iniciales del movimiento dentario ortodónico con aparatología fija, comparando su evolución a lo largo del tiempo.
4. Valorar posibles asociaciones entre los cambios en los niveles de IL-1 $\beta$  en el fluido crevicular gingival y la intensidad del dolor percibida por el paciente durante los estadios iniciales del movimiento dentario ortodónico.



# Materia l y



## 4. Material y método

---

### 4.1 Selección de la población de estudio:

Se seleccionaron 29 pacientes adultos (15 mujeres, con una edad media de  $21,8 \pm 1,2$  años y 14 hombres, con una edad media de  $21,2 \pm 1,5$  años) que presentaban separación entre al menos un canino superior y el primer premolar superior del mismo lado, e iban a ser tratados ortodóncicamente mediante aparatología fija multibrackets.

Los criterios utilizados en la selección muestral fueron:

- Criterios de inclusión:
  - Edad: comprendida entre los 18 y los 25 años
  - Origen caucásico
  - Presencia de diastema entre canino y primer premolar superior del mismo lado  $\geq 1,5$  mm
- Criterios de exclusión:
  - Pacientes en tratamiento con antibióticos en los seis meses anteriores al inicio del estudio
  - Pacientes en tratamiento con antiinflamatorios en el mes anterior al inicio del estudio
  - Pacientes con algún tipo de enfermedad sistémica o alteraciones metabólicas o endocrinas
  - Pacientes con enfermedad gingival o periodontal, demostrable mediante una profundidad de sondaje  $\geq 3$  mm o evidencia radiográfica de pérdida ósea
  - Pacientes con mala higiene bucodental

- pacientes fumadores

Todos los pacientes fueron informados de las características del estudio. Se obtuvo su firma de conformidad en la participación del mismo en un consentimiento informado otorgado previamente.

## 4.2 Diseño del estudio

Previo al inicio de este estudio longitudinal prospectivo, dos semanas antes, cada participante recibió un tratamiento de profilaxis e instrucciones de higiene oral.

Todos los participantes mostraron su consentimiento para seguir estrictamente dichas indicaciones. Los pacientes fueron instruidos para no tomar ninguna medicación, incluyendo antiinflamatorios no esteroideos, durante el periodo del estudio. Se realizaron controles de placa y motivación durante todo el estudio

### 4.2.1 Movimiento ortodóncico

Se cementaron brackets (0.022 x 0.028 pulgadas, Mini Master, American Orthodontics, Sheboygan, WI, USA, técnica MBT) en la cara vestibular de los caninos superiores seleccionados como dientes experimentales. Se cementó un tubo de cementado directo de la misma casa comercial en el primer molar superior del mismo lado del diente experimental. Desde este tubo se aplicó una fuerza continua de 100 g sobre el bracket cementado en el canino elegido como diente experimental por medio de un coil spring de níquel-titanio GAC Sentalloy 100 gr Closed Coil Springs (GAC International Inc, Bohemia, NY, USA).

La magnitud de la fuerza aplicada fue ajustada mediante un calibre ortodóncico (YS-31D Push pull gauge. YDM Corporation, Saitama 355-0042, Japan), asegurando el mantenimiento de los 100 gr en todo momento del estudio.

De este modo el lado distal del canino experimental fue considerado como la zona de compresión al tomar las muestras, mientras que el lado mesial fue considerado el lado de tensión.

El diente control fue el canino superior contralateral, que no llevó ningún tipo de aparatología ortodóncica, ni recibió ningún tipo de fuerza.

#### 4.2.2 Visitas

Se recogieron muestras de fluido crevicular en mesial (tensión) y distal (compresión) del diente experimental y en distal del diente control en los siguientes momentos :

V0: 0 horas, justo antes de aplicar la fuerza ortodóncica.

V1: 24 horas después de aplicar la fuerza ortodóncica.

V2: 7 días después de aplicar la fuerza ortodóncica.

V3: 28 días después de aplicar la fuerza ortodóncica.

#### 4.2.3 Parámetros clínicos

En cada cita se evaluaron los siguientes parámetros clínicos en el diente experimental y control así como en los dientes adyacentes a éstos.

- Índice de placa: se observó de manera visual y mediante una sonda

periodontal la presencia o no de placa en 3 localizaciones por diente y se le asignó un valor de 0 a 3 según el Índice de Sillnes y Loe [50] .

- Índice gingival: el estado gingival se evaluó en función de dos criterios. Primero se determinó la condición gingival en tres localizaciones por diente, siguiendo los criterios del Índice Gingival Modificado por Lobene [51].
- Índice de sangrado al sondaje: en segundo lugar, se valoró el sangrado al sondaje mediante una sonda periodontal en tres localizaciones por diente según los criterios de Mühlemann y Son [52].

Como se comentó anteriormente, antes de comenzar el estudio, se hizo profilaxis, motivación y entrenamiento en técnicas de higiene a todos los pacientes. Una vez conseguida la motivación, colaboración, la habilidad y el mantenimiento de estos índices por debajo del 15% se comenzó el estudio. Además en cada visita se supervisaron estos criterios antes de la toma de muestra de fluido crevicular.

Se estipuló como criterio que los índices de placa, de gingivitis y de sangrado estuviesen en todo momento por debajo del 15 % a todo lo largo del estudio, para garantizar la buena higiene oral de cada uno de los pacientes y eliminar la posible influencia de la placa bacteriana, inflamación gingival y sangrado sobre los niveles de IL-1 $\beta$  en el fluido crevicular gingival. Dicho requisito fue cubierto por todos los pacientes.

El discomfort o dolor se midió mediante una escala analógica visual (VAS) en cada momento del estudio, previo a la recogida del fluido crevicular y a las medidas de los índices periodontales.

#### 4.2.4 Recogida del fluido crevicular gingival

Las muestras de fluido crevicular se tomaron con puntas de papel tipo Periopaper según protocolo descrito anteriormente [53, 54]). Los dientes seleccionados se aislaron con rollos de algodón, se eliminó la placa bacteriana con una cureta y se secaron cuidadosamente con aire. Se introdujeron las tiras de papel 1 mm subgingivalmente, y se mantuvieron in situ durante 30 segundos. Si alguna de las muestras resultó contaminada por saliva o sangre, se desechó y se esperó al menos 10 minutos para la toma de una nueva muestra en la misma localización.

El volumen de la muestra recogida por el periopaper se midió por medio de un Periotrón 8000 (Harco) previamente calibrado.

Cada muestra fue colocada en un tubo tipo Eppendorf de 1,5 ml, etiquetada y almacenada a una temperatura de -80° C, para posteriormente procesarlas todas juntas, una vez terminada la fase clínica del estudio.

Registro/etiquetado de las muestras (imagen 3 ):

1. número del paciente
2. visita del paciente
3. diente: control mesial (CM) ; experimental mesial (EM); experimental distal (ED)

#### 4.2.5 Evaluación del discomfort o dolor

En la visita basal el paciente relleno un breve cuestionario para evaluar la experiencia previa con el dolor general y dental. La experiencia previa del dolor general fue evaluada con una escala analógica visual (VAS) de 100 mm, con dos puntos finales, etiquetados como “no dolor” en la izquierda y “máximo dolor” en la derecha. La misma escala fue usada para medir el dolor dental relativo a situaciones experimentadas previamente.

Las molestias o dolor durante el periodo del estudio también fue evaluado por medio de una VAS. Los pacientes indicaron su nivel actual de intensidad de dolor espontáneo y de dolor experimentado mientras apretaban rollos de algodón tanto en el diente experimental y control.

#### 4.2.6 Análisis de la muestras

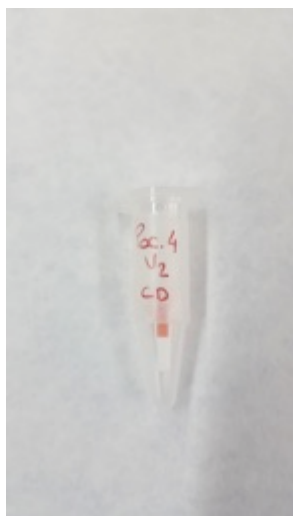
Los niveles de IL-1 $\beta$  del diente experimental y del diente control fueron analizados mediante un inmunoensayo Multiplex por citometría de flujo, usando microesferas magnéticas.

El día del análisis se preparó una solución de extracción que se mantuvo en todo momento en hielo. La solución estaba compuesta de:

- ❖ 1XPBS (mantenido a temperatura de 4°C) 49 mls
- ❖ PMSF (200mM en MeOH) 250  $\mu$ l
- ❖ Aprotinina (1mg/ml en dH<sub>2</sub>O) 500  $\mu$ l
- ❖ Serum de albúmina humana (30%) 167  $\mu$ l

La muestra de fluido crevicular (imagen 3 y 4) se extrajo de la tira de Periopaper

usando esta solución de extracción. La tira de Periopaper se depositaba en el extremo de un tubo de poliestireno marcado con los datos de la muestra ( Deltalab, Ref.301201, imagen 5 y 6), sobre la parte blanca de la tira se depositaba cuidadosamente 20  $\mu$ l de dicha solución ( imagen 7 ). Seguidamente se sujetaba la muestra con la tapa del tubo (Deltalab, Ref. 3055) y se centrifugaba a 2000 rpm, 4°C durante 5 minutos (Eppendorf Centrifuga 5810R, imagen 8). Este proceso se repitió un total de 5 veces para conseguir una muestra de 100 $\mu$ l al final del proceso. En el último lavado la tira de Periopaper era desechada y sólo se mantuvo la solución obtenida.



**Imagen 3.** Tubo Eppendorf con tira de Periopaper



**Imagen 4.** Varias muestras en sus respectivos tubos Eppendorf conservada en hielo

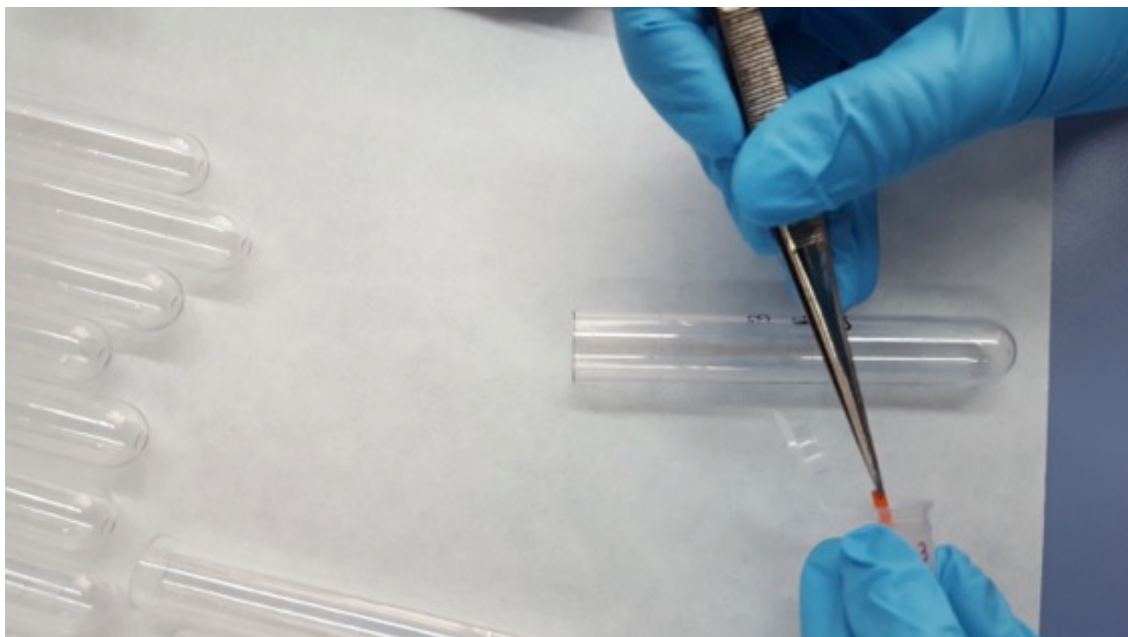


Imagen 5. Traspaso de la muestra del tubo Eppendorf al tubo de ensayo

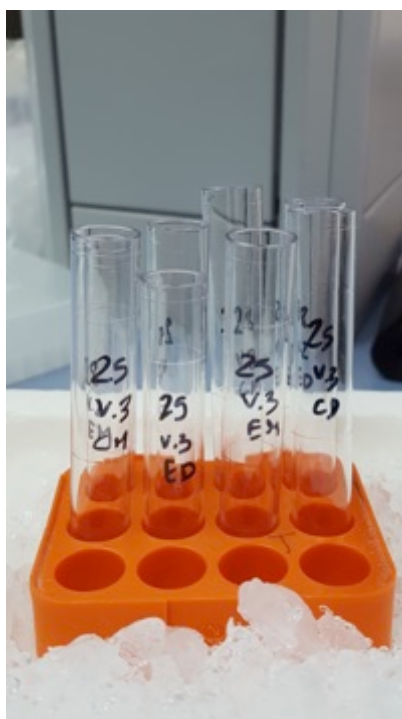


Imagen 6. Tubos de ensayos cónicos.



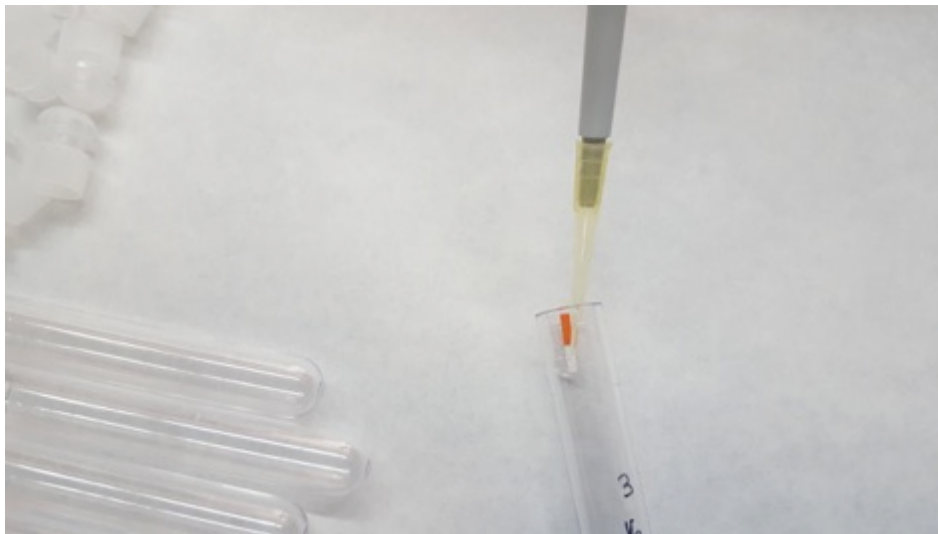


Imagen 7. Colocación de 20  $\mu$ l de solución de extracción sobre la tira de Periopaper



Imagen 8 Centrifugadora 5810R Eppendorf

#### 4.2.6.1 Preparación del reactivo

El primer paso fue preparar los estándares y para ello lo primero fue obtener un vial con 250  $\mu$ l que contuviera el antígeno que en nuestro caso era IL-1 $\beta$  junto con el antígeno de la proteína C reactiva y TNF- $\alpha$  que no fueron objetivo de esta tesis pero que se analizaron igualmente en las mismas muestras. Se centrifugó el vial donde venía cada antígeno 2000 x g durante 10 segundos, después se obtuvieron 150  $\mu$ l de la solución que contenía los antígenos y se centrifugó de nuevo a 2000 x g durante 10 segundos y se incubó en hielo durante 10 minutos. A continuación se añadió 100  $\mu$ l del buffer de extracción, obteniendo un total de 250  $\mu$ l.

Para realizar la dilución de los estándares se tomaron ocho tubos y se enumeraron de S<sub>0</sub> a S<sub>7</sub>. Del vial preparado anteriormente que contenía el antígeno se tomaron 200  $\mu$ l y se rellenó con esto el primer estándar S<sub>1</sub>. Se añadieron 150  $\mu$ l de buffer de extracción en los tubos de S<sub>2</sub> a S<sub>7</sub>. Después se traspasaron del estándar S<sub>1</sub> 50  $\mu$ l al estándar S<sub>2</sub> bombeando la mezcla con la pipeta durante 10 veces. De este último se tomaron 50  $\mu$ l y se rellenó el siguiente, y así sucesivamente hasta rellenar el estándar 7 (Imagen 9). En el estándar S<sub>0</sub> se añadieron 200  $\mu$ l de buffer de extracción de manera que sirviera de control al no llevar concentración de antígeno. De esta manera obtuvimos unos estándares que contenía el antígeno IL-1 $\beta$  a distintas concentraciones con las que comparar nuestras muestras en la lectura (Imagen 10).

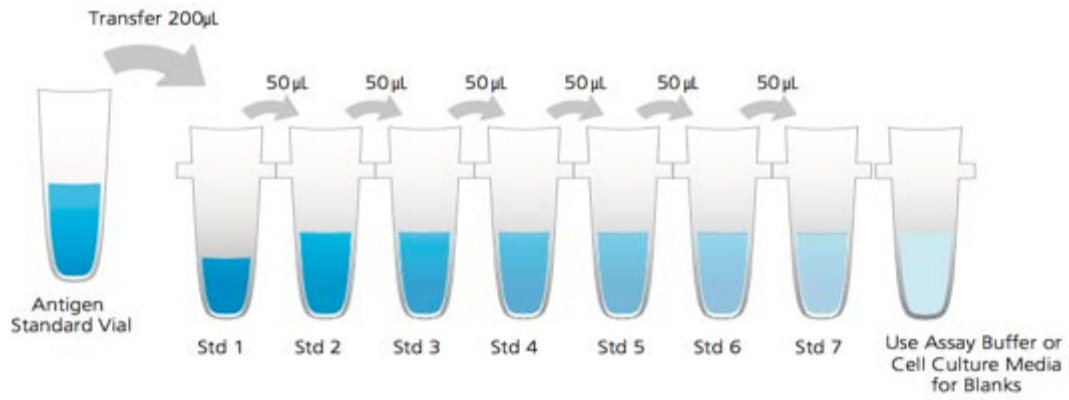


Imagen 9 Esquema de la dilución para obtener los estándares

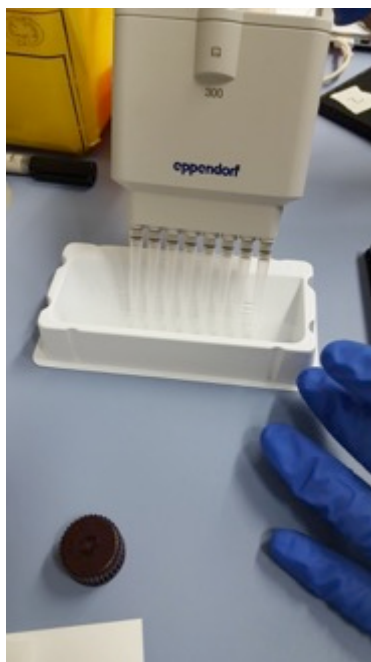


Imagen 10 Estándares preparados y etiquetados

El siguiente paso fue preparar el buffer de lavado, previa agitación en el mezclador vortex durante 15 segundos. Se mezcló 20 ml de ésta solución de buffer de lavado concentrado 10X con 180 mL de ddH<sub>2</sub>O.

#### 4.2.6.2 Protocolo del ensayo

Lo primero que se organizó es el diseño de la disposición de las muestras en las placas con la misma nomenclatura que se había usado para etiquetar las muestras (paciente, visita, control distal, diente experimental mesial y diente experimental distal ). Seguidamente se procedió a preparar las esferas magnéticas, se vibraron en vortex durante 30 segundos, y se añadieron 50 µl de la solución de las microesferas magnéticas en cada pozo de las placas usando una pipeta multicanal (imagen 11).



**Imagen 11** Pipeta multicanal con la solución de microesferas magnéticas

Después se insertó firmemente la placa con los 96 pocillos en la carcasa magnética comprobando que quedaba bien sujeta por las lengüetas y se esperó 2 minutos para que las microesferas magnéticas se asentaran en el fondo de cada pozo.

Se eliminó el líquido sobrante rápidamente invirtiendo la placa y echándolo a un fregadero y se aplicó papel absorbente sobre la superficie para eliminar cualquier solución residual (imagen 12).



Imagen 12 Placa número 4 insertada en la carcasa magnética

Seguidamente se añadieron 150  $\mu$ l de buffer de lavado (1X) en cada pocillo y se esperó 30 segundos eliminado igualmente el contenido al verterlo invirtiendo la placa rápidamente sobre el fregadero y limpiando los restos con papel absorbente,

una vez realizado este paso se eliminó de la placa la carcasa magnética. Este procedimiento se realizó en cada una de las placas que iban a contener las muestras.

A partir de este momento se añadieron 50 µl de los estándares  $S_0$  a  $S_7$  por duplicado en la primera placa y 50 µl de cada muestra en cada uno de los pocillos hasta rellenar las 4 placas que habíamos organizado al principio (ejemplo de placa 1, imagen 13).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	S4	1-V0- CD	1-V0- ED	1-V0- EM	1-V1- CD	1-V1- ED	1-V1- EM	1-V2- CD	1-V2- ED	1-V2- EM	1-V3- CD
B	0	S4	1-V3- ED	1-V3- EM	2-V0- CD	2-V0- ED	2-V0- EM	2-V1- CD	2-V1- ED	2-V1- EM	2-V2- CD	2-V2- ED
C	S1	S5	2-V2- EM	2-V3- CD	2-V3- ED	2-V3- EM	3-V0- CD	3-V0- ED	3-V0- EM	3-V1- CD	3-V1- ED	3-V1- EM
D	S1	S5	3-V2- CD	3-V2- ED	3-V2- EM	3-V3- CD	3-V3- ED	3-V3- EM	4-V0- CD	4-V0- ED	4-V0- EM	4-V1- CD
E	S2	S6	4-V1- ED	4-V1- EM	4-V2- CD	4-V2- ED	4-V2- EM	4-V3- CD	4-V3- ED	4-V3- EM	5-V0- CD	5-V0- ED
F	S2	S6	5-V0- EM	5-V1- CD	5-V1- ED	5-V1- EM	5-V2- CD	5-V2- ED	5-V2- EM	5-V3- CD	5-V3- ED	5-V3- EM
G	S3	S7	6-V0- CD	6-V0- EM	6-V1- CD	6-V1- ED	6-V1- EM	6-V2- CD	6-V2- ED	6-V2- EM	6-V3- CD	6-V3- ED
H	S3	S7	6-V3- EM	7-V0- CD	7-V0- ED	7-V0- EM	7-V1- CD	7-V1- ED	7-V1- EM	7-V2- CD	7-V2- ED	7-V2- EM

**Imagen 13** Organización de la placa 1 en Excel para tener todos los datos etiquetados antes de su lectura

El siguiente paso fue sellar y tapar las placas con su tapadera correspondiente y se mantuvieron agitándose durante 30 minutos a temperatura ambiente a 500 revoluciones por minuto (rpm), después se incubaron durante toda la noche a 4°. Tras la incubación se sacaron del lugar de almacenaje y se volvieron a agitar otros 30 minutos a temperatura ambiente y 500 rpm, (imagen 14).

Continuando el protocolo se añadió 25 µl del anticuerpo de detección (1X) en cada pozo y se sellaron de nuevo las placas para incubarlas 30 minutos en el agitador a 500 rpm. A continuación se lavaron los pocillos dos veces con buffer de lavado del mismo modo que se ha explicado anteriormente. Se añadieron 50 µl de solución de SAPE (Streptavidin, R-Phycoerythrin Conjugate ) y se taparon de nuevo las muestras para incubarlas en el agitador 30 min a 500 rpm, se lavaron de nuevo dos veces todas las placas y se añadió por último 120 µl del buffer de lectura en cada pocillo tapando e incubando la muestra otros 5 minutos a temperatura ambiente 500 rpm. Para finalizar se tomaron las placas y se llevaron a su lectura en el Luminex (imagen 15 y 16), calibrándolo previamente a 50 µl de tamaño muestral, DD gates 5,000-25,000; durante 60 segundos y con una región de esferas ente 50-100.



Imagen 14 Agitador con las placas





Imagen 15 Lector Luminex 200

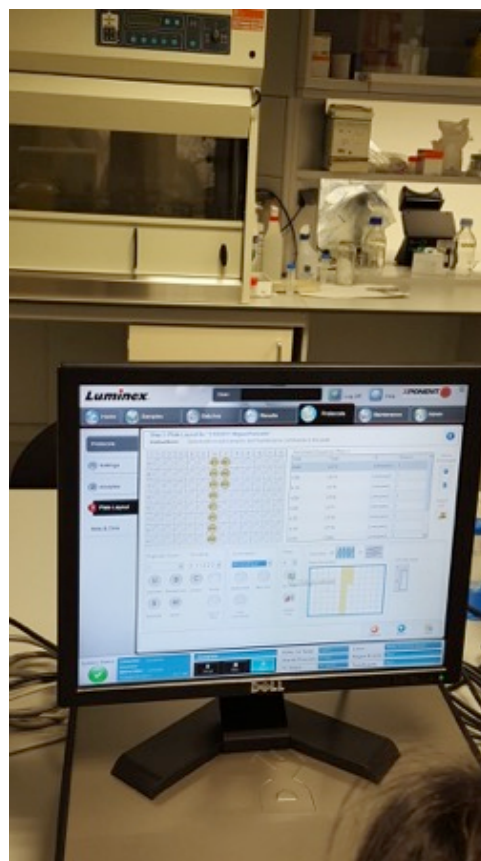


Imagen 16 Lector Luminex 200

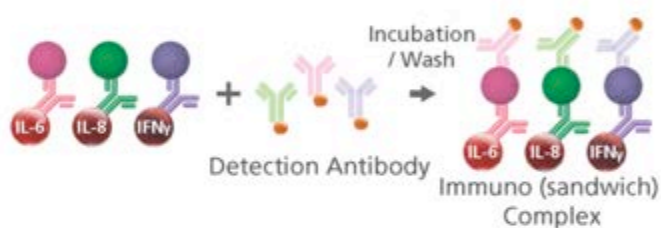


Figure 1



Añadir las esferas  
revestidas de  
anticuerpos para la  
captura específica en  
nuestro caso de IL-1 $\beta$   
Se incuba y se lava

Figure 2



Se añade el anticuerpo  
de detección, se incuba  
y se lava

Figure 3



Se añade detector  
fluorescente SAPE, se  
incuba y se lava

Figure 4



Se leen las placas y se  
analizan los resultados

Esquema 2. Protocolo de preparación de las muestras antes de su lectura.

## 4.2.7 Análisis de los datos

### 4.2.7.1 Estadística descriptiva


Para todas las variables del estudio se calcularon las medias, desviaciones estándar e intervalos de confianza para cada grupo en todos los momentos analizados. Para describir las variables categóricas, se utilizaron frecuencias (porcentajes).

### 4.2.7.2 Estadística analítica

Se planificó analizar las diferencias intra e intergrupo en cada momento, comparando los tres lados entre sí (control vs. Tensión vs. Compresión). Para comprobar si cumplían el supuesto de normalidad se aplicó el test de Shapiro Wilks. Seguidamente, al cumplir el supuesto de normalidad, se analizaron las diferencias intra (visitas) e intergrupo (lados) utilizando un test de Anova paramétrico de dos vías para medias repetidas con contrastes a posteriori de Bonferroni.

Se aplicó el coeficiente de correlación de Pearson para valorar la posible asociación entre los niveles de dolor en las distintas visitas y los valores de IL-1 $\beta$  para los distintos lados estudiados. El coeficiente oscila entre los valores 0 y 1 ó 0 y -1, y se asocia un grado de significación estadística al mismo.

Los análisis se llevaron a cabo con el paquete estadístico SPSS versión 22. El nivel de significación estadística se estableció en  $P < 0.05$  al 95%.



Resulta  
do

## 5. Resultados

### 5.1 Valores de IL 1 $\beta$

#### 5.1.1 IL- 1 $\beta$ expresada en pg/30 segundos

El volumen de las muestras de fluido crevicular oscilaba entre los 0,01 y los 0,6  $\mu$ l .

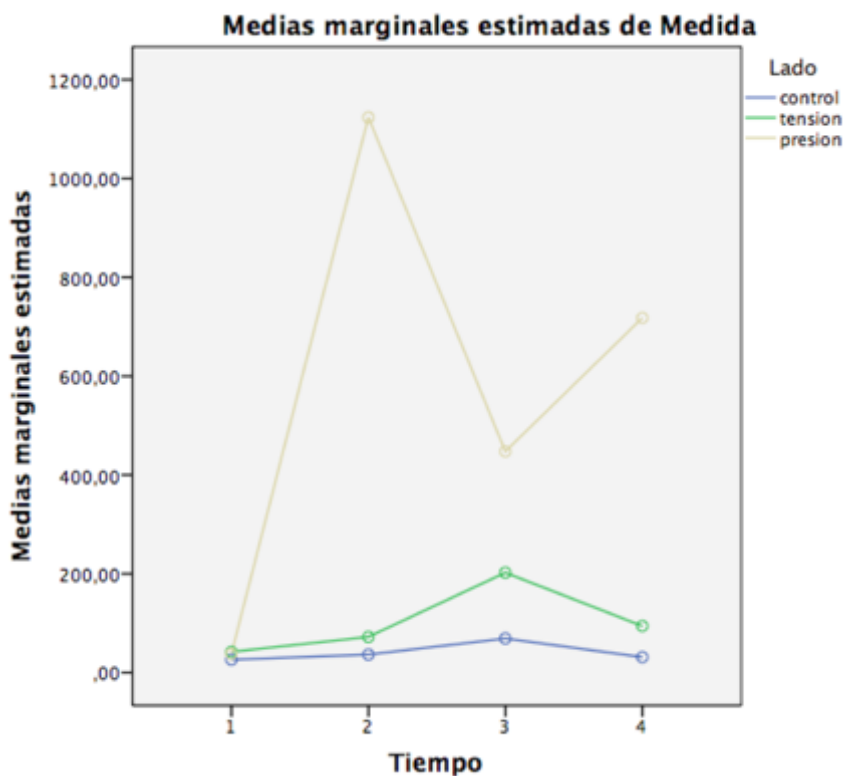
La tabla 2 muestra la estadística descriptiva de los niveles de IL-1 $\beta$  expresados como la cantidad total en picogramos (pg) por 30 segundos de recogida de la muestra, en el lado de tensión y compresión del diente experimental y en el lado distal del diente control. Igualmente, se muestra la significación total del ANOVA considerando tanto los tres lados analizados como las diferentes visitas efectuadas.

Tensión		Compresión		Control		p	
	pg/30s		pg/30s		pg/30s		0,110
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	
Basales	42,04	92,33	38,03	67,22	26,21	49,13	
24 h	72,28	218,16	1123,51	2653,99	36,51	84,68	
7días	202,41	730,62	447,60	1048,59	69,12	151,87	
28 días	94,26	164,86	717,82	2057,49	31,32	43,28	

**Tabla 2.** Estadística descriptiva y ANOVA global de los niveles de IL 1 $\beta$  expresados como la cantidad total por 30 segundos de recogida de muestra en el lado de tensión, compresión y control durante el estudio. DS: desviación estándar. La significación del ANOVA global fue de p=0,110

La significación del ANOVA global fue de p=0,110, por lo que las diferencias al comparar lados conjuntamente con el factor tiempo de las distintas visitas, no fueron significativas.

La figura 1 representa la evolución de los valores de IL-1 $\beta$  (pg/30 seg) a lo largo del tiempo.



**Figura 1.** Evolución de los valores de IL-1 $\beta$  medios en los sitios de tensión, compresión y control durante el estudio. Color amarillo lado de presión, azul lado control y verde lado de tensión.

En la tabla 3 aparecen las comparaciones dos a dos para los lados, para la cantidad de IL-1 $\beta$  en el lado de compresión frente al lado de tensión y control, considerando todas las visitas juntas. Las comparaciones entre tensión-compresión y compresión-control fueron estadísticamente significativas ( $p=0,001$  y  $p\leq 0,001$  respectivamente).

	Diferencia de medias	I C		Significación p
		Lím inf	Lím sup	
Tensión-compresión	<b>- 478,992*</b>	-161,524	-796,461	0,001
Tensión-control	61,957	-245,710	369,624	1,000
Compresión-control	<b>540,949*</b>	218,200	863,699	<0,001

**Tabla 3.** Diferencia de medias para la comparación dos a dos para los valores de IL-1 $\beta$  entre lados, juntando los valores de todas las visitas.

\* La diferencia de medias es significativa en el nivel  $p \leq 0,05$ .

La tabla 4 muestra la comparación entre los diferentes momentos del estudio para los niveles de IL-1 $\beta$  (pg/30seg), comparando dos a dos las visitas y separando los lados de tensión, compresión y control.

Analizando el lado de compresión, aparecen diferencias significativas al comparar la medición basal con las primeras 24 horas, la medición basal con los primeros 7 días y la medición basal con los 28 días tras el inicio de aplicación de la fuerza ortodóncica. Por tanto, existe un aumento de IL-1 $\beta$  en el lado de compresión significativamente mayor en las primeras 24 horas tras iniciar el movimiento, que después se mantiene a los 7 y a los 28 días con respecto a los valores basales antes de iniciar el movimiento ortodóncico.

	Tensión			Compresión			Control		
	Dif Medias	IC (Lím inf	Lím sup)	Dif Medias	IC ( Lím inf	Lím sup )	Dif Medias	IC ( Lím inf	Lím sup)
V0-24h	-30,24	-759,11	698,62	<b>-1085,48*</b>	-1886,69	-284,281	-10,30	-765,69	745,07
V0-7d	-160,37	-522,67	201,92	<b>-409,57*</b>	-807,82	-11,319	-42,91	-418,39	332,56
V0-28d	-52,22	-621,09	516,65	<b>-679,79*</b>	-1305,13	-54,461	-5,11	-594,68	584,45
24h-7d	-130,12	-960,04	699,79	675,91	-236,36	1588,196	-32,60	-892,71	827,50
24h-28d	-21,97	-984,07	940,12	405,69	-651,89	1463,270	5,19	-991,90	1002,28
7d-28d	108,15	-588,41	804,72	-270,22	-1035,92	495,476	37,79	-684,11	759,70

**TABLA 4** Diferencias entre los momentos del estudio para los niveles de IL-1 $\beta$  (pg/30seg), comparando dos a dos las visitas y separando los lados de tensión, compresión y control.

\* La diferencia de medias es significativa en el nivel  $p \leq 0,05$ . IC: Intervalo de confianza al 95%. LI: límite inferior LS: límite superior.

La tabla 5 muestra las comparaciones entre los diferentes lados para los niveles de IL-1 $\beta$  (pg/30seg), comparando dos a dos los tres lados considerados y separando por cada visita. Encontramos diferencias significativas en la cantidad de IL-1 $\beta$  en las primeras 24 horas al comparar el lado de compresión respecto al lado de tensión y respecto al control ( $p = 0,032$  y  $p = 0,029$  respectivamente).

	V0			24h			7d			28d		
	Dif de Medias	IC		Dif de medias	IC		Dif de medias	IC		Dif de medias	IC	
		LI	LS		LI	LS		LI	LS		LI	LS
Tensión-compresión	4,01	-44,99	53,01	<b>-1051,23*</b>	-2035,43	-67,03	-245,18	-737,01	246,64	-623,56	-1386,16	139,03
Tensión-control	15,83	-31,66	63,32	35,77	-918,04	989,58	133,29	-343,35	609,93	62,93	-676,11	801,98
compresión-control	11,82	-38,00	61,64	<b>1086,99*</b>	86,43	2087,57	378,48	-121,53	878,49	686,50	-88,78	1461,78

**Tabla 5.** Diferencias de medias entre los lados para los niveles de IL-1 $\beta$  (pg/30seg), comparando dos a dos los tres lados considerados, y separando por cada visita.

Dif de medias: diferencia de medias IC: intervalo de confianza al 95% LI: límite inferior LS: límite superior.

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel  $p \leq 0,05$ .

### 5.1.2 IL- 1 $\beta$ expresada en pg/valor neto de periotrón

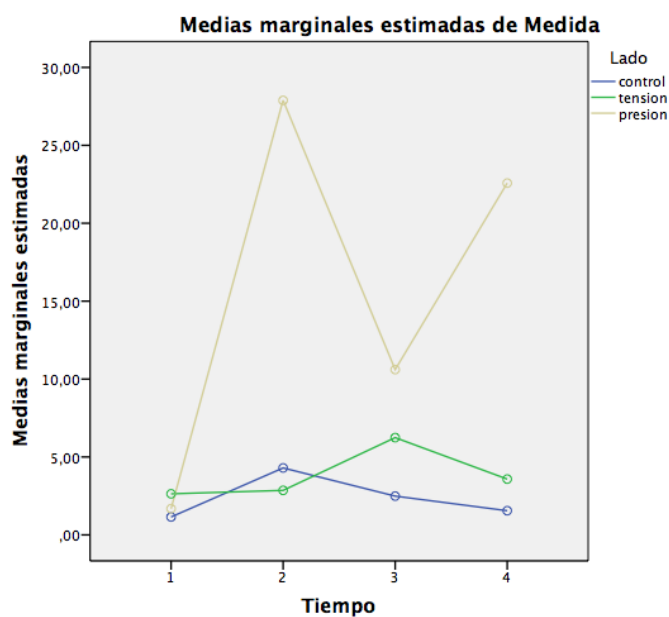
La tabla 6 muestra la estadística descriptiva de los niveles de IL-1 $\beta$  expresados como la cantidad total en picogramos (pg) por valor neto de periotrón, en el lado de tensión y comprensión del diente experimental y en el lado distal del diente control. Igualmente, se muestra la significación total del ANOVA teniendo en cuenta tanto los tres lados considerados como las diferentes visitas efectuadas.



Tensión		Compresión		Control		p
pg/valor neto de periotrón						
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Basales	2,6355	6,62786	1,6837	2,97311	1,1500	1,71175
24 h	2,8566	8,02350	27,8846	75,2316	4,2974	17,40253
7días	6,2431	16,71828	10,6100	24,47510	2,4896	5,12368
28 días	3,5810	5,77889	22,5762	66,46338	1,5515	1,57697

**Tabla 6.** Estadística descriptiva y ANOVA global de los niveles de IL-1 $\beta$  expresados como la cantidad total por valor neto de periotrón en el lado de tensión, compresión y control durante el estudio. DS: desviación estándar. La significación del ANOVA global fue de  $p=0,267$ .

La figura 2 representa la evolución de los valores de IL-1 $\beta$  (pg/valor de periotrón) a lo largo del tiempo.



**Figura 2.** Evolución de los valores de IL 1 $\beta$  medios en los sitios de tensión, compresión y control durante el estudio. Color amarillo lado de presión, azul lado control y verde lado de tensión.

En la tabla 7 aparecen las comparaciones dos a dos para los lados, para la cantidad de IL-1 $\beta$  en el lado de compresión frente al lado de tensión y control, considerando todas las visitas juntas. Las comparaciones entre tensión-compresión y compresión-control fueron estadísticamente significativas ( $p=0,008$  y  $p=0,003$  respectivamente).

	Diferencia de medias	I C		Significación p
		Lím inf	Lím sup	
Tensión-compresión	<b>-11,860*</b>	-21,239	-2,481	0,008
Tensión-control	1,457	-7,632	10,546	1,000
compresión-control	<b>13,317*</b>	3,782	22,851	0,003

**Tabla 7.** Diferencia de medias para la comparación dos a dos para los valores de IL-1 $\beta$  entre lados, juntando los valores de todas las visitas

\* La diferencia de medias es significativa en el nivel  $p \leq 0,05$ .

La tabla 8 muestra las diferencias entre los momentos del estudio para los niveles de IL-1 $\beta$  (pg/valor de periotrón), comparando dos a dos las visitas y separando los lados de tensión, compresión y control.

Aparecen diferencias significativas en el lado de compresión al comparar la medición basal con las primeras 24 horas y la medición basal con los 28 días tras el inicio ( $p=0,021$  y  $p=0,040$  respectivamente). En las primeras 24 horas tras iniciar

el movimiento existe un aumento de IL-1 $\beta$  en el lado de compresión significativamente mayor que después se mantiene a los 28 días con respecto a los valores basales antes de iniciar el movimiento ortodóncico.

	Tensión			Compresión			Control		
	Dif de Medias	IC( Lím inf	Lím sup)	Dif de Medias	IC( Lím inf	Lím sup)	Dif de Medias	IC( Lím inf	Lím sup)
V0-24h	-0,221	-21,683	21,241	<b>-26,201*</b>	-49,792	-2,609	-3,147	-25,390	19,095
V0-7d	-3,608	-12,348	5,133	-8,926	-18,535	,682	-1,340	-10,398	7,719
V0-28d	-0,946	-19,378	17,487	<b>-20,893*</b>	-41,154	-0,631	-0,401	-19,504	18,701
24h-7d	-3,387	-26,804	20,031	17,275	-8,467	43,016	1,808	-22,462	26,077
24h-28d	-0,724	-30,104	28,655	5,308	-26,987	37,604	2,746	-27,702	33,194
7d-28d	2,662	-18,054	23,378	-11,966	-34,738	10,806	0,938	-20,531	22,408

**Tabla 8.** Diferencias entre los momentos del estudio para los niveles de IL-1 $\beta$  por valor neto de periotrón comparando dos a dos las visitas y separando los lados de tensión, compresión y control

\*La diferencia de medias es significativa en el nivel  $p \leq 0,05$ . IC: Intervalo de confianza al 95%. LI: límite inferior LS: límite superior.

La tabla 9 muestra las diferencias entre los lados para los niveles de IL-1 $\beta$  (pg/valor de periotrón), comparando dos a dos los tres lados considerados y separando cada visita. No se han encontrado diferencias significativas en la cantidad de IL-1 $\beta$  a lo largo de las visitas comparando el lado de tensión con el de compresión ni en tensión y compresión respecto a los controles.

	V0			24h			7d			28 d		
	Dif de Medias	IC		Dif de medias	IC		Dif de medias	IC		Dif de medias	IC	
		LI	LS		LI	LS		LI	LS		LI	LS
Tensión-compresión	0,952	-2,038	3,942	-25,028	-53,811	3,754	-4,367	-15,857	7,123	-18,995	-43,648	5,658
Tensión-control	-1,486	-4,383	1,412	-1,441	-29,335	26,453	3,753	-7,382	14,889	2,030	-21,862	25,921
Compresión-control	0,534	-2,506	3,574	23,587	-5,674	52,848	8,120	-3,561	19,801	21,025	-4,038	46,088

**Tabla 9.** Diferencias de medias entre los lados para los niveles de IL-1 $\beta$  (pg/valor neto periotrón), comparando dos a dos los tres lados considerados y separando por cada visita.

Dif de medias: diferencia de medias IC: intervalo de confianza LI: límite inferior LS: Limite superior.

### 5.1.3 IL 1 $\beta$ expresada en pg/ $\mu$ l de periotrón

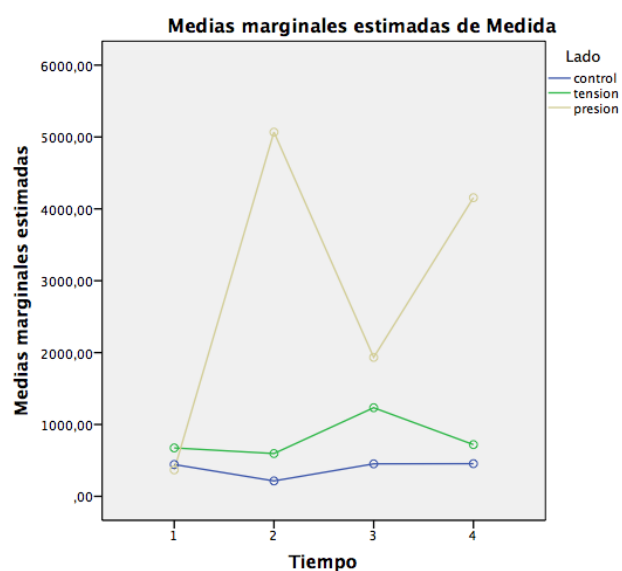
La tabla 10 muestra la estadística descriptiva de los niveles de IL-1 $\beta$  expresados como la cantidad total en picogramos (pg) por  $\mu$ l de periotrón, en el lado de tensión y compresión del diente experimental y en el lado distal del diente control. Además, se muestra la significación total del ANOVA considerando tanto los tres lados analizados como las diferentes visitas efectuadas, que fue de  $p=0,241$ .

Tensión		Compresión		Control		p
pg/ µl de periotrón						
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Basales	673,93	1724,35	368,500	612,98	443,16	1192,29
24 h	595,69	1533,75	5067,29	14105,69	214,602	305,90
7días	1233,36	2988,91	1933,58	4338,04	452,18	971,77
28 días	719,74	1085,79	4155,65	12257,05	454,63	748,17

**Tabla 10.** Estadística descriptiva y ANOVA global de los niveles de IL-1 $\beta$  expresados como la cantidad total por  $\mu$ l de periotrón de muestra en el lado de tensión, compresión y control durante el estudio. DS: desviación estándar.

La significación del ANOVA global fue de  $p=0,241$

La figura 3 representa la evolución de los valores de Interleuquina-1 $\beta$  (pg/  $\mu$ l de periotrón)



**Figura 3.** Evolución de los valores de IL-1 $\beta$  medios en los sitios de tensión, compresión y control

En la tabla 11 aparecen las comparaciones dos a dos para los lados, para la cantidad de IL-1 $\beta$  en el lado de compresión frente al lado de tensión y control, considerando todas las visitas juntas. Las comparaciones entre tensión-compresión y compresión-control fueron estadísticamente significativas ( $p=0,014$  y  $p=0,003$ , respectivamente).

	Diferencia de medias	I C		Significación p
		Lím inf	Lím sup	
Tensión-compresión	<b>-2075,574*</b>	-3812,333	-338,815	0,014
Tensión-control	414,540	-1303,108	2132,188	1,000
compresión-control	<b>2490,114*</b>	691,538	4288,689	0,003

**Tabla 11.** Diferencia de medias para la comparación dos a dos para los valores de IL-1 $\beta$  entre lados, juntando los valores de todas las visitas

\*La diferencia de medias es significativa en el nivel  $p \leq 0,05$ . IC: Intervalo de confianza al 95%. LI: límite inferior LS: límite superior.

La tabla 12 muestra las diferencias entre los momentos del estudio para los niveles de IL-1 $\beta$  (pg/ $\mu$ l de periotrón), comparando dos a dos las visitas y separando los lados de tensión, compresión y control.

En esta tabla únicamente aparece como diferencia significativa la cantidad de IL-1 $\beta$  por  $\mu$ l de periotrón ( $p=0,03$ ) en el lado de compresión al comparar la medición basal con las primeras 24 horas. El resto de comparaciones dos a dos de la

medición basal a los 7 y a los 28 días del movimiento no fueron estadísticamente significativas.

	Tensión			Compresión			Control		
	Media	IC Lím inf	IC Lím sup	Media	IC Lím inf	IC Lím sup	Media	IC Lím inf	IC Lím sup
V0-24h	78,243	-3920,063	4076,550	<b>-4698,797*</b>	-9093,904	-303,690	228,560	-4077,748	4534,868
V0-7d	-559,429	-2226,644	1107,785	-1565,089	-3397,761	267,583	-9,024	-1804,669	1786,621
V0-28d	-45,804	-3527,551	3435,942	-3787,157	-7614,439	40,125	-11,476	-3761,431	3738,480
24h-7d	-637,673	-4972,497	3697,151	3133,708	-1631,313	7898,730	-237,584	-4906,333	4431,164
24h-28d	-124,048	-5599,759	5351,663	911,640	-5107,492	6930,772	-240,036	-6137,557	5657,485
7d-28d	513,625	-3338,115	4365,365	-2222,068	-6456,063	2011,927	-2,452	-4150,903	4145,999

**Tabla 12.** Diferencias entre los momentos del estudio para los niveles de IL-1 $\beta$  por  $\mu$ l de periotrón comparando dos a dos las visitas, y separando los lados de tensión, compresión y control \*La diferencia de medias es significativa en el nivel  $p \leq 0,05$ . IC: Intervalo de confianza al 95%. LI: límite inferior LS: límite superior.

La tabla 13 muestra las diferencias entre los lados para los niveles de IL-1 $\beta$  (pg/ $\mu$ l de periotrón), comparando dos a dos los tres lados considerados y separando cada visita. No se han encontrado diferencias significativas en la cantidad de IL-1 $\beta$  a lo largo de las visitas comparando el lado de tensión con el de compresión ni en tensión y compresión respecto al control.

	V0			24h			7d			28d		
	Dif de	IC		Dif de	IC		Dif de	IC		Dif de	IC	
	Medias	LI	LS	medias	LI	LS	medias	LI	LS	medias	LI	LS
Tensión-compresión	305,43	-570,51	1181,38	-4471,60	-9789,41	846,21	-700,22	-2773,01	1372,57	-3435,91	1181,68	1181,68
Tensión-control	230,77	-635,53	1097,08	381,09	-4878,20	5640,39	781,18	-1268,80	2831,16	265,10	-4301,67	4831,89
Compresión-control	-74,66	-981,79	832,46	4852,69	-654,39	10359,78	1481,40	-665,17	3627,97	3701,01	-1080,93	8482,96

**Tabla 13.** Diferencias de medias entre los lados para los niveles de IL-1 $\beta$  (pg/ $\mu$ l de Periotrón), comparando dos a dos los tres lados considerados y separando por cada visita.  
Dif de medias: diferencia de medias IC: intervalo de confianza LI: límite inferior LS: Límite superior.

## 5.2 Evaluación del disconfort o dolor

La tabla 14 muestra la media y desviación estándar para cada uno de los dolores generales a los que contestaban los pacientes en función de una VAS. El dolor general tipo 1 se correspondía con el dolor de hacerse un corte en el dedo, el dolor tipo 2 aquel generado por la picadura de una abeja/avispa, el dolor tipo 3 el dolor provocado al sacar una astilla o espina, el tipo 4 con el de torcerse un tobillo, y por último el tipo 5 con ponerse una vacuna.

En cuanto a la valoración de estos dolores generales, el cuestionario reveló que el mayor dolor percibido por los pacientes fue la picadura de una abeja/avispa seguido de torcerse un tobillo.



Dolor	Media	Desviación estándar
Gral1	3,014	1,9988
Gral2	4,077	2,2723
Gral3	2,014	1,4774
Gral4	4,058	1,6914
Gral5	2,276	1,6688
Gral Media	3,0683	1,13324

**Tabla 14** Medias calculadas para cada uno de los valores que les otorgaban los pacientes, mediante una VAS, a los dolores generales. Dolor Gral 1: . Hacerse un corte en el dedo; Gral 2: Picadura de avispa/abeja; Gral 3: sacar una astilla o espina; Gral 4: Torcerse un tobillo; Gral 5: Ponerse una vacuna.

Para describir los dolores asociados a los dientes concretos estudiados, se utilizó esta nomenclatura:

DEE: dolor espontáneo en el diente experimental

DEC : dolor espontáneo en el diente control

DME : dolor en el diente experimental al morder un rollo de algodón

DMC : dolor en el diente control al morder un rollo de algodón

En la tabla 15 aparece la estadística descriptiva de los niveles de dolor tanto espontáneo como al morder un rollo de algodón de los dientes control y experimental en la visita inicial, a las 24 horas de comenzar el tratamiento, 7 días y 28 días después de iniciar el movimiento, así como la significación total del ANOVA tomando todos los datos del dolor experimentado en cada diente y todas las visitas, que fue  $p \leq 0,001$ .

	DEE		DEC		DME		DMC		Significación
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	
V0	0,025	0,0844	0,089	0,4533	0,004	0,0189	0,057	0,3024	≤ 0,001
24h	0,603	1,0900	0,028	0,0996	2,576	2,6218	0,038	0,1860	
7d	0,086	0,2615	0,014	0,0581	0,786	1,2029	0,003	0,0186	
28d	0,076	0,1845	0,003	0,0186	0,921	1,4077	0,003	0,0186	

**Tabla 15** Estadística descriptiva y ANOVA global de los niveles de dolor expresados en cada visita del estudio. DS: desviación estándar.  
La significación del ANOVA global fue de  $p < 0,001$ .

En la tabla 16 aparecen las diferencias analizadas comparando dos a dos la visita inicial con la visita a las 24 horas, con la visita a los 7 días y con la visita a los 28 días entre sí, en función de si se trata del dolor espontáneo del diente experimental, del diente control o del dolor al morder un rollo de algodón.

	DEE			DEC			DME			DMC		
	Media	ICLI	ICLS	Media	ICLI	ICLS	Media	ICLI	ICLS	Media	ICLI	ICLS
V0-24h	<b>-0,578*</b>	-0,986	-0,171	0,062	-0,103	0,226	<b>-2,572*</b>	-3,720	-1,425	0,019	-0,106	0,145
V0-7d	-0,061	-0,468	0,346	0,075	-0,089	0,240	-0,783	-1,930	0,365	0,054	-0,072	0,179
V0-28d	-0,051	-0,458	0,356	0,086	-0,079	0,250	-0,917	-2,065	0,230	0,054	-0,072	0,179
24h-7d	<b>0,517*</b>	0,114	0,921	0,014	-0,149	0,177	<b>1,790*</b>	0,652	2,927	0,034	-0,090	0,159
24h-28d	<b>0,528*</b>	0,124	0,931	0,024	-0,139	0,187	<b>1,655*</b>	0,518	2,792	0,034	-0,090	0,159
7d-28d	0,010	-0,393	0,414	0,010	-0,153	0,173	-0,134	-1,272	1,003	0,000	-0,124	0,124

**Tabla 16** Diferencias de medias comparando dos a dos las visitas basal, 24 horas, 7 y 28 días en los niveles de dolor espontáneo en el diente experimental, en el control y el dolor al morder un rollo de algodón en el diente experimental y control. ICLI: Límite inferior del Intervalo de Confianza al 95%; ICLS: Límite superior del Intervalo de Confianza al 95%

\* La diferencia de medias es significativa en el nivel  $p \leq 0,05$

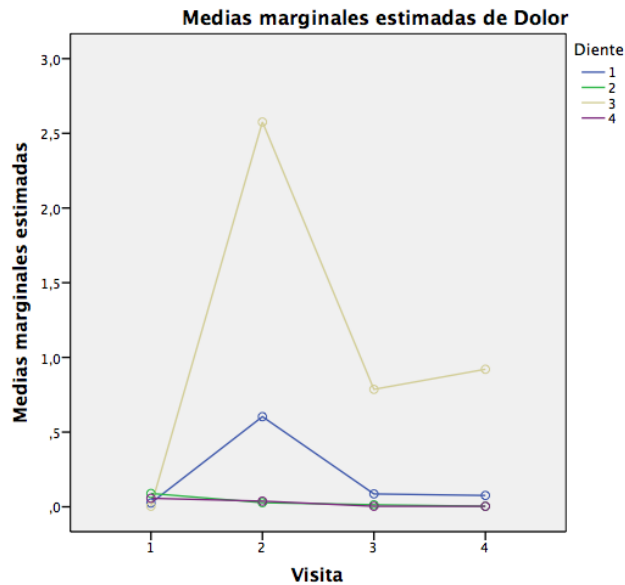
En la tabla 17 aparecen las diferencias comparadas dos a dos combinado entre sí el dolor espontáneo en el diente experimental, el dolor espontáneo en el diente control, el dolor al morder un rollo de algodón en el diente experimental y el dolor al morder un rollo de algodón en el diente control, a lo largo de las distintas visitas.

	V0			24h			7d			28 d		
	Dif de Medias	IC		Dif de medias	IC		Dif de medias	IC		Dif de medias	IC	
		LI	LS		LI	LS		LI	LS		LI	LS
DEE-DEC	-0,064	-0,378	0,249	<b>0,576*</b>	0,268	0,884	0,072	-0,236	0,380	0,072	-0,236	0,380
DEE-DME	0,021	-0,755	0,797	<b>-1,972*</b>	-2,735	-1,210	-0,700	-1,462	0,062	<b>-0,845*</b>	-1,607	-0,082
DEE-DMC	-0,032	-0,302	0,238	<b>0,566*</b>	0,300	0,831	0,083	-0,182	0,348	0,072	-0,193	0,338
DEC-DME	0,086	-0,740	0,911	<b>-2,548*</b>	-3,359	-1,737	-0,772	-1,584	0,039	<b>-0,917*</b>	-1,728	-0,106
DEC-DMC	0,032	-0,117	0,182	-0,010	-0,157	0,136	0,010	-0,136	0,157	0,000	-0,147	0,147
DME-DMC	-0,054	-0,863	0,756	<b>2,538*</b>	1,743	3,333	0,783	-0,013	1,578	<b>0,917*</b>	0,122	1,713

**Tabla 17.** Diferencias de medias comparadas dos a dos entre el dolor del diente experimental y control de manera espontánea y al morder un rollo de algodón durante las distintas visitas.

. \*. La diferencia de medias es significativa en el nivel  $p \leq 0,05$ . IC: Intervalo de confianza al 95%. LI: límite inferior LS: límite superior.

La Figura 4 muestra la gráfica de evolución del dolor espontáneo y al morder un rollo de algodón del diente experimental y control a lo largo de las visitas.



**Figura 4** Evolución de los valores del dolor espontáneo, y al morder un rollo de algodón en los dientes experimental y control a lo largo del estudio.

Color azul: Dolor espontáneo en el diente experimental

Color verde: dolor espontáneo en el diente control

Color amarillo: dolor al masticar diente experimental

Color morado: dolor al masticar diente control

### 5.3 Relación entre los niveles de IL $1\beta$ en el fluido crevicular y la intensidad de dolor percibida

La tabla 18 analiza la relación entre los datos de los valores de IL- $1\beta$  del lado de tensión, compresión y control y los valores del dolor experimentado por los pacientes en el diente experimental y control de manera espontánea o al morder un rollo de algodón.

		Tensión	Compresión	Control	DEE	DEC	DME	DMC
Tensión	Coef de Pearson	1	0,021	0,097	-0,064	-0,032	-0,096	0,008
	Sig.		0,830	0,307	0,492	0,737	0,309	0,935
Compresión	Coef de Pearson	0,021	1	0,143	0,000	-0,015	<b>0,252**</b>	-0,044
	Sig.	0,830		0,143	0,998	0,875	0,008	0,646
Control	Coef de Pearson	0,097	0,143	1	-0,110	-0,036	-0,066	-0,035
	Sig.	0,307	0,143		0,248	0,707	0,486	0,714

**Tabla 18** Correlaciones entre los valores de IL-1 $\beta$  en el lado de tensión, compresión y control y el dolor asociado en el diente experimental y control de manera espontánea o al morder un rollo de algodón.

\*\* La correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas).

Los análisis estadísticos indican un aumento del dolor en el diente experimental tanto espontáneo como al morder un rollo de algodón frente al diente control a las 24 horas de comenzar el movimiento. Al cabo de los 28 días no hay diferencias entre el dolor espontáneo del diente experimental y del diente control pero sin embargo sí que existen diferencias significativas entre el dolor del diente experimental frente al control al morder un rollo de algodón.

Existe además una correlación significativa entre el dolor en el diente experimental al morder un rollo de algodón con un aumento en los niveles de IL-1 $\beta$  en lado de compresión de dicho diente. Por lo tanto podemos decir que en los dientes donde se aplica una fuerza ortodóncica, hay una asociación positiva entre el aumento de IL-1 $\beta$  y un aumento de la percepción del dolor por parte de los pacientes al morder un rollo de algodón.

An abstract painting featuring vertical bands of color, including blue, green, red, and white, with a central text box containing the words "Discusi" and "ón".

# Discusi ón

## 6. Discusión

---

### 6.1. Selección de la muestra

La selección de los 29 pacientes que constituyeron la muestra final se hizo con el método de inclusión consecutiva de casos o muestreo consecutivo, en el que se seleccionan los pacientes que cumplen los criterios de inclusión/exclusión durante un periodo determinado.

Aunque el muestreo consecutivo sea una técnica de muestreo no probabilística, ya que no todos los sujetos tienen la misma probabilidad de ser incluidos, puede ser representativa de la población objeto de estudio [16].

Para conocer el tamaño muestral se comprobaron estudios anteriores sobre el fluido crevicular con una sistemática parecida y se encontró que los estudios son escasos, con muestras pequeñas que oscilaban entre los 10 y 18 pacientes. En nuestro caso se decidió tomar una muestra más amplia de 30 pacientes (15 hombres y 15 mujeres). Aunque partíamos de 30 casos, uno de ellos fue excluido del estudio por no cumplir con las estrictas normas de control de higiene, superando los índices de placa, gingival y/o sangrado al sondaje, por encima del 15% mínimo exigido.

Como criterios de selección de la muestra se estableció que los pacientes no hubieran recibido tratamiento con antiinflamatorios el mes anterior al inicio del estudio, ni terapia antibiótica en los seis meses previos al inicio del estudio, ya que estas sustancias podrían afectar la liberación de algunos mediadores de la inflamación así como alterar la respuesta inmune. Concretamente, la IL-1 $\beta$  es un mediador de la inflamación y podrían verse afectados los resultados [49].

Igualmente era importante descartar aquellos pacientes con enfermedad gingival o periodontal, demostrable mediante una profundidad de sondaje  $\geq 3$  mm o evidencia radiográfica de pérdida ósea. Así como aquellos que tenían una mala higiene oral, ya que la inflamación en la región periodontal altera el contenido de mediadores bioquímicos del fluido crevicular [21]. Por ello se estipuló que en todos los pacientes el índice de placa, gingival y de sangrado al sondaje, estuviesen en todo momento por debajo del 15% para garantizar una buena higiene, y de este modo los resultados no se viesen afectados por estos motivos [22].

## 6.2 Selección de la Técnica

Se decidió un protocolo a boca partida, en el cual el mismo paciente actuase como control y como experimental, seleccionando un canino superior como diente a recibir la fuerza ortodóncica y dejando al canino contralateral sin ninguna acción, para servir de referencia y comparar posibles cambios.

El diente experimental se dividió en dos zonas a la hora de tomar las muestras el lado de tensión y el lado de compresión. Esto nos permite ser mucho más específicos y concretos a la hora de describir los cambios que se producen en estas dos zonas opuestas en las que se aparecen fenómenos de aposición y reabsorción ósea respectivamente.

Las muestras fueron analizadas por procedimientos de inmunoensayo Multiplex por citometría de flujo; este sistema de detección es de última generación y es un método bien establecido de cuantificación de citoquinas en muestras líquidas.



Asimismo presenta una mayor sensibilidad y especificidad a la hora de detectar IL-1 $\beta$  en comparación con el método ELISA [55].

Entre sus numerosas ventajas destaca que genera datos cuantitativos de muchos analitos en una muestra de menos de 50  $\mu$ l, algo muy útil cuando el volumen es limitante, como en el caso de fluido crevicular gingival. Además permite medir múltiples marcadores, en este caso se utilizó para medir también proteína C reactiva y TNF- $\alpha$ , si bien no fueron objeto del presente estudio.

### 6.3 Análisis de los Resultados

En el fluido crevicular existen una serie de factores celulares y bioquímicos que reflejan el estado del periodonto subyacente [28]. En él se han encontrado varios marcadores bioquímicos relacionados con la reabsorción ósea, como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , sustancia P ó  $\beta$ -glucuronidasa, y con la formación ósea, como osteocalcina ó leptina [22, 54, 56, 57].

El análisis bioquímico de los componentes del fluido crevicular nos ha provisto de un modelo no invasivo para investigar la respuesta celular del ligamento periodontal durante el movimiento dental ortodóncico en vivo [54].

Actualmente existen pocos indicadores bioquímicos que nos indiquen los cambios que sufre el diente cuando se le somete a fuerzas ortodóncicas. Ante la aplicación de una fuerza se ha visto que el primer proceso que se produce es una respuesta inflamatoria. Esta respuesta inflamatoria cursa con una liberación de mediadores inflamatorios como las interleuquinas. Se ha demostrado que la IL-1 $\beta$  es la citoquina más potente para estimular la actividad de los osteoclastos y atraer a

leucocitos y otros mediadores celulares para procesar la remodelación ósea. Es el primer polipéptido mediador de la función de la célula inmune para regular la reabsorción ósea y la formación ósea por estrés mecánico[24]. Por todo ellos nos puede servir como un indicador bioquímico que nos reflejaría de forma cuantitativa el proceso de remodelación ósea durante el tratamiento ortodóncico.

Aunque existen pocos estudios in vivo sobre el fluido crevicular en ortodoncia, antes de comenzar el nuestro valoramos artículos científicos en los que se detectara la presencia de IL-1 $\beta$  en el fluido crevicular. Entre ellos, varios estudios demostraban que existe un aumento de IL-1 $\beta$  durante el movimiento ortodóncico. [22, 24, 30].

En nuestro estudio tomamos un diente experimental al que se le sometió a una fuerza ortodóncica de 100 g y otro control sobre el que no se aplicó ningún tratamiento. Nuestros datos muestran que en los dientes control no se encuentran cambios significativos en los niveles de IL-1 $\beta$ . Los dientes control no estaban sometidos a ninguna fuerza ortodóncica, sino a un proceso de remodelación óseo fisiológico, es decir no existía ningún proceso de inflamación y reabsorción que supusiera un cambio en el medio por lo cual la cantidad de IL-1 $\beta$  se mantuvo constante.

En cuanto al diente experimental, sometido a una fuerza de tracción ortodóncica, en el lado de tensión donde se produce un proceso de aposición ósea, no se registraron cambios significativos en las concentraciones de IL-1 $\beta$ . Quizás esto se explique porque el proceso de formación ósea está regulado por otros mecanismos en los cuales la IL-1 $\beta$  no está involucrada tan activamente.

Por el contrario, en el lado de compresión del diente experimental se ha hallado un

incremento significativo de los niveles de IL-1 $\beta$  a las 24 horas de iniciar el movimiento. Este incremento a las 24 h se aprecia con los tres métodos de valoración de la IL-1 $\beta$  utilizados en nuestra investigación, si bien el método que detecta la IL-1 $\beta$  total recogida durante 30 segundos también reflejó incrementos significativos a los 7 y a los 28 días respecto al valor basal. Con este protocolo de medición, el aumento significativo en la cantidad de IL-1 $\beta$  registrado a los 7 días fue menor que a las 24 horas y a los 28 días. Estos resultados podrían atribuirse a que ante la aplicación de una fuerza sobre un diente, en el lado de compresión se producen unos cambios bioquímicos muy rápidos como respuesta inmediata a la “agresión” que supone la aplicación de la fuerza, aumentando a las 24 horas la cantidad de IL-1 $\beta$ , y que después, a los 7 días estos niveles disminuyen ligeramente porque probablemente tras la reabsorción inicial se produce una aposición ósea. Estas fluctuaciones pueden explicarse por las actividades biológicas y regulación del metabolismo óseo que se produce a lo largo del movimiento dentario ya que a los 28 días se mantiene el aumento de IL-1 $\beta$ , indicando que la reabsorción no cesa mientras hay aplicación de fuerza.

Los niveles de IL-1 $\beta$  se han medido considerando no sólo la cantidad de la misma, medida en pg durante 30 segundos, si no que se ha tenido en cuenta también la cantidad en función de los valores netos y  $\mu$ l de volumen registrados por Periotrón. Esto permite ser más precisos en el registro de los parámetros bioquímicos teniendo en cuenta los problemas inherentes en la determinación de la cantidad en función del volumen de fluido crevicular [30]. Como se ha comentado anteriormente, en los tres casos existe un aumento de IL-1 $\beta$  comparando el valor basal y el valor a las 24 horas de iniciar el movimiento, en el lado de compresión,

siendo una diferencia significativa. Sin embargo no hay coincidencia en los resultados obtenidos a los 7 y a los 28 días, en los que sólo son significativos los aumentos detectados en la cantidad de IL-1 $\beta$  recogidos durante los 30 segundos de toma de muestra. Así pues no podemos descartar que dichos incrementos en los niveles de IL-1 $\beta$  estuvieran influenciados por un aumento potencial en el volumen de fluido crevicular gingival, que se produce al iniciarse el tratamiento ortodóncico.

Nuestros resultados están en concordancia con los encontrados por varios autores. Existe un aumento de IL-1 $\beta$  en los dientes experimentales en los que se aplica una fuerza ortodóncica que es significativamente mayor que la encontrada en los dientes control y cuyo valor es máximo a las 24 horas de iniciar el movimiento [22-24, 27, 30, 58]. Como novedad con respecto a otros estudios, en nuestra investigación incluimos un análisis detallado de los lados de tensión y compresión y además utilizamos un tratamiento de ortodoncia común con aparatología fija multibrackets, aplicando una fuerza constante de 100 g sobre el diente experimental.

Otro de los objetivos de la presente investigación era analizar los niveles de dolor percibidos por el paciente durante los estadios iniciales del movimiento dentario ortodóncico con aparatología fija, comparando su evolución a lo largo del tiempo. Para ello sometimos a cada paciente a un cuestionario donde contestaban utilizando una escala analógica visual (VAS). En nuestro estudio no sólo se valoró el dolor espontáneo sino que se introdujo como novedad una tarea funcional a la hora de evaluar dolor al apretar un rollo de algodón. Los resultados indican que hay un aumento del dolor en las primeras 24 horas, que es cuando la IL-1 $\beta$  alcanza

su máxima concentración en el lado de compresión del diente experimental. Estos datos coinciden con los de otros autores, en los que el dolor aumenta sobre todo en las primeras 24 horas una vez iniciado el movimiento dentario [24, 30, 59].

Además hemos evaluado si había asociación entre el grado de dolor/discomfort percibido por el paciente y los niveles de IL-1 $\beta$  hallados en el fluido crevicular durante los estadios iniciales del tratamiento ortodóncico. Los resultados obtenidos indican una asociación positiva entre los niveles de IL-1 $\beta$  detectados en el lado de compresión y el dolor/discomfort percibido por el paciente.

No obstante, debemos tener en cuenta que el dolor percibido es un dato con una gran variabilidad intersujetos. La percepción del dolor es subjetiva y está condicionada fuertemente por factores como el sexo, la personalidad y especialmente por factores tanto emocionales como medioambientales, incluyendo la cultura, la edad y el estrés. Por ejemplo, en el estudio de Iwasaki y cols. se describe cómo, ante una situación de estrés en la zona de presión, aumenta la cantidad de IL-1 $\beta$  y existe a su vez una relación con la velocidad del movimiento [58].

Por otro lado, la experiencia dolorosa general y dental también deben tenerse en cuenta, por eso en el cuestionario se incluyeron preguntas sobre dolores generales previos [30].

Los resultados hallados en nuestro estudio están en línea con los demás estudios similares, sin embargo distan mucho en cuanto a mediadores analizados en fluido crevicular (IL-1 $\beta$ , calcitonina, PGE2, etc.) o la metodología utilizada (análisis multiplex, uso de Periotrón, etc.) [22-24].

A pesar de las limitaciones de nuestro estudio sobre todo a la hora de poder

cuantificar el dolor de una manera más objetiva, el análisis del fluido crevicular nos aporta información sobre el comportamiento de diferentes marcadores bioquímicos, como la IL-1 $\beta$ , durante el movimiento dental ortodónico, de una manera no invasiva.



An abstract painting with vertical strokes of blue, red, green, and white, creating a textured, layered effect. The colors are blended and layered, giving it a sense of depth and movement.

Conclus  
ion



## 7. Conclusiones

---

Tras analizar los resultados obtenidos hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1. La IL-1 $\beta$  está presente en el fluido crevicular gingival y puede detectarse y cuantificarse mediante la técnica de inmunoensayo Multiplex por citometría de flujo.
2. Los niveles de IL-1 $\beta$  en el fluido crevicular gingival aumentaron significativamente en el lado de compresión a las 24 h tras aplicar una fuerza ortodóncica constante de 100 g. Por el contrario, en el lado de tensión no se detectaron cambios significativos en los niveles de IL-1 $\beta$ .
3. Se detectaron diferencias en los resultados obtenidos entre los tres métodos de cuantificación de la IL-1 $\beta$  utilizados. La medición en función del tiempo de recogida de muestra señaló incrementos significativos en los niveles de IL-1 $\beta$  a las 24h, 7d y 28d con respecto a los niveles basales, mientras que la cuantificación en función del volumen neto y por  $\mu$ l registrado por Periotrón solo señalaron diferencias significativas a las 24h.
4. El aumento en los niveles de IL-1 $\beta$  en el lado de compresión mostró una asociación positiva con la intensidad de dolor percibida por el paciente al morder un rollo de algodón tras la aplicación de fuerzas ortodóncicas.



# Bibliog rafía

## 8. Bibliografía

---

1. Will LA: **Orthodontic Tooth Movement: A Historic Prospective**. *Frontiers of oral biology* 2016, **18**:46-55.
2. Teixeira CC, Khoo E, Tran J, Chartres I, Liu Y, Thant LM, Khabensky I, Gart LP, Cisneros G, Alikhani M: **Cytokine expression and accelerated tooth movement**. *Journal of dental research* 2010, **89**(10):1135-1141.
3. Gómez de Ferraris M: **Histología y embriología bucodental**. Madrid, España; 2002.
4. Del Fattore A, Teti A, Rucci N: **Bone cells and the mechanisms of bone remodelling**. *Frontiers in bioscience* 2012, **4**:2302-2321.
5. Feng X, McDonald JM: **Disorders of bone remodeling**. *Annual review of pathology* 2011, **6**:121-145.
6. Tang Y, Wu X, Lei W, Pang L, Wan C, Shi Z, Zhao L, Nagy TR, Peng X, Hu J *et al*: **TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation**. *Nature medicine* 2009, **15**(7):757-765.
7. Wise GE, King GJ: **Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement**. *Journal of dental research* 2008, **87**(5):414-434.
8. de Paula FJ, Rosen CJ: **Back to the future: revisiting parathyroid hormone and calcitonin control of bone remodeling**. *Hormone and metabolic research* 2010, **42**(5):299-306.
9. Linde D: **Niveles de calcitonina en el fluido crevicular gingival y en saliva y grado de discomfort durante la fase inicial del movimiento ortodóncico en pacientes jóvenes** Universidad de Granada; 2014.

10. Xie R, Kuijpers-Jagtman AM, Maltha JC: **Osteoclast differentiation during experimental tooth movement by a short-term force application: an immunohistochemical study in rats.** *Acta odontologica Scandinavica* 2008, **66**(5):314-320.
11. Martin TJ, Udagawa N: **Hormonal regulation of osteoclast function.** *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 1998, **9**(1):6-12.
12. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR: **Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors.** *Nature* 1986, **319**(6053):516-518.
13. Davidovitch Z, Krishnan V: **Adverse effects of orthodontics: a report of 2 cases.** *World journal of orthodontics* 2008, **9**(3):e18-31.
14. Yamaguchi M: **RANK/RANKL/OPG during orthodontic tooth movement.** *Orthodontics & craniofacial research* 2009, **12**(2):113-119.
15. Sari E, Ucar C: **Interleukin 1beta levels around microscrew implants during orthodontic tooth movement.** *The Angle orthodontist* 2007, **77**(6):1073-1078.
16. Iwasaki LR, Chandler JR, Marx DB, Pandey JP, Nickel JC: **IL-1 gene polymorphisms, secretion in gingival crevicular fluid, and speed of human orthodontic tooth movement.** *Orthodontics & craniofacial research* 2009, **12**(2):129-140.
17. Nakano T, Hotokezaka H, Hashimoto M, Sirisoontorn I, Arita K, Kurohama T, Darendeliler MA, Yoshida N: **Effects of different types of tooth movement and force magnitudes on the amount of tooth movement and root resorption in rats.** *The Angle orthodontist* 2014, **84**(6):1079-1085.

18. Yee JA, Turk T, Elekdag-Turk S, Cheng LL, Darendeliler MA: **Rate of tooth movement under heavy and light continuous orthodontic forces.** *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics* 2009, **136**(2):151-159.
19. George A EC: **Detection of root resorption using dentin and bone markers.** *Orthodontics & craniofacial research* 2009 **12**(3):229-235.
20. Kereschanan S SP, Waddington R.: **Identification of dentine sialoprotein in gingival crevicular fluid during physiological root resorption and orthodontic tooth movement.** *European journal of orthodontics* 2008, **30**(3):307-314.
21. Alhadlaq AM: **Biomarkers of Orthodontic Tooth Movement in Gingival Crevicular Fluid: A Systematic Review.** *The journal of contemporary dental practice* 2015, **16**(7):578-587.
22. Dudic A, Kiliaridis S, Mombelli A, Giannopoulou C: **Composition changes in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: comparisons between tension and compression sides.** *European journal of oral sciences* 2006, **114**(5):416-422.
23. Grieve WG, 3rd, Johnson GK, Moore RN, Reinhardt RA, DuBois LM: **Prostaglandin E (PGE) and interleukin-1 beta (IL-1 beta) levels in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement.** *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics* 1994, **105**(4):369-374.
24. Luppapornlarp S, Kajii TS, Surarit R, Iida J: **Interleukin-1beta levels, pain intensity, and tooth movement using two different magnitudes of**

- continuous orthodontic force.** *European journal of orthodontics* 2010, **32**(5):596-601.
25. Barbieri G, Solano P, Alarcon JA, Vernal R, Rios-Lugo J, Sanz M, Martin C: **Biochemical markers of bone metabolism in gingival crevicular fluid during early orthodontic tooth movement.** *The Angle orthodontist* 2013, **83**(1):63-69.
26. Castroflorio T, Gambero EF, Caviglia GP, Deregibus A: **Biochemical markers of bone metabolism during early orthodontic tooth movement with aligners.** *The Angle orthodontist* 2017, **87**(1):74-81.
27. Basaran G, Ozer T, Kaya FA, Kaplan A, Hamamci O: **Interleukine-1beta and tumor necrosis factor-alpha levels in the human gingival sulcus during orthodontic treatment.** *The Angle orthodontist* 2006, **76**(5):830-836.
28. Keresahanan S, Stephenson P, Waddington R: **Identification of dentine sialoprotein in gingival crevicular fluid during physiological root resorption and orthodontic tooth movement.** *European journal of orthodontics* 2008, **30**(3):307-314.
29. Rhee SH, Kang J, Nahm DS: **Cystatins and cathepsin B during orthodontic tooth movement.** *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics* 2009, **135**(1):99-105.
30. Giannopoulou C, Dudic A, Kiliaridis S: **Pain discomfort and crevicular fluid changes induced by orthodontic elastic separators in children.** *The journal of pain* 2006, **7**(5):367-376.
31. Aznan K, Khan M, Benson PE: **Gingival temperature measurements with fluoride and nonfluoride elastomeric ligatures.** *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics* 2007, **131**(3):378-383.

32. Eder C: **Mechanisms of interleukin-1beta release.** *Immunobiology* 2009, **214**(7):543-553.
33. de Oliveira CM, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomao R: **Cytokines and pain.** *Revista brasileira de anestesiologia* 2011, **61**(2):255-259, 260-255, 137-242.
34. Lotze MT, Zeh HJ, Rubartelli A, Sparvero LJ, Amoscato AA, Washburn NR, Devera ME, Liang X, Tor M, Billiar T: **The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity.** *Immunological reviews* 2007, **220**:60-81.
35. Di Virgilio F: **Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome.** *Trends in pharmacological sciences* 2007, **28**(9):465-472.
36. Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S: **Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells.** *Bone* 1999, **25**(3):255-259.
37. Davidovitch Z, Nicolay OF, Ngan PW, Shanfeld JL: **Neurotransmitters, cytokines, and the control of alveolar bone remodeling in orthodontics.** *Dental clinics of North America* 1988, **32**(3):411-435.
38. Gowen M, Wood DD, Ihrie EJ, McGuire MK, Russell RG: **An interleukin 1 like factor stimulates bone resorption in vitro.** *Nature* 1983, **306**(5941):378-380.
39. Saito S, Ngan P, Saito M, Kim K, Lanese R, Shanfeld J, Davidovitch Z: **Effects of cytokines on prostaglandin E and cAMP levels in human periodontal ligament fibroblasts in vitro.** *Archives of oral biology* 1990, **35**(5):387-395.

40. Lynch P, Davidovitch Z, Shanfeld J: **Interleukin-1 at bone resorption sites: localization during tooth movement in vivo.** *Journal of dental research* 1988, **67**:1474.
41. Allan SM, Tyrrell PJ, Rothwell NJ: **Interleukin-1 and neuronal injury.** *Nature reviews Immunology* 2005, **5**(8):629-640.
42. Simi A, Tsakiri N, Wang P, Rothwell NJ: **Interleukin-1 and inflammatory neurodegeneration.** *Biochemical Society transactions* 2007, **35**(Pt 5):1122-1126.
43. Church LD, Cook GP, McDermott MF: **Primer: inflammasomes and interleukin 1beta in inflammatory disorders.** *Nature clinical practice Rheumatology* 2008, **4**(1):34-42.
44. Apte RN, Dotan S, Elkabets M, White MR, Reich E, Carmi Y, Song X, Dvozkin T, Krelin Y, Voronov E: **The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions.** *Cancer metastasis reviews* 2006, **25**(3):387-408.
45. Dinarello CA: **Biologic basis for interleukin-1 in disease.** *Blood* 1996, **87**(6):2095-2147.
46. Dinarello CA: **Blocking IL-1 in systemic inflammation.** *The Journal of experimental medicine* 2005, **201**(9):1355-1359.
47. Burger D, Dayer JM, Palmer G, Gabay C: **Is IL-1 a good therapeutic target in the treatment of arthritis?** *Best practice & research Clinical rheumatology* 2006, **20**(5):879-896.
48. Otasevic M, Naini FB, Gill DS, Lee RT: **Prospective randomized clinical trial comparing the effects of a masticatory bite wafer and avoidance of hard food on pain associated with initial orthodontic tooth**



- movement.** *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics* 2006, **130**(1):9-15.
49. Sandhu SS, Cheema MS, Khehra HS: **Comparative effectiveness of pharmacologic and nonpharmacologic interventions for orthodontic pain relief at peak pain intensity: A Bayesian network meta-analysis.** *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics* 2016, **150**(1):13-32.
50. Silness J, Loe H: **Periodontal Disease in Pregnancy. Ii. Correlation between Oral Hygiene and Periodontal Condition.** *Acta odontologica Scandinavica* 1964, **22**:121-135.
51. Lobene RR, Weatherford T, Ross NM, Lamm RA, Menaker L: **A modified gingival index for use in clinical trials.** *Clinical preventive dentistry* 1986, **8**(1):3-6.
52. Muhlemann HR, Son S: **Gingival sulcus bleeding--a leading symptom in initial gingivitis.** *Helvetica odontologica acta* 1971, **15**(2):107-113.
53. Toygar HU, Kircelli BH, Bulut S, Sezgin N, Tasdelen B: **Osteoprotegerin in gingival crevicular fluid under long-term continuous orthodontic force application.** *The Angle orthodontist* 2008, **78**(6):988-993.
54. Dilsiz A, Kilic N, Aydin T, Ates FN, Zihni M, Bulut C: **Leptin levels in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement.** *The Angle orthodontist* 2010, **80**(3):504-508.
55. Ooi KG, Galatowicz G, Towler HM, Lightman SL, Calder VL: **Multiplex cytokine detection versus ELISA for aqueous humor: IL-5, IL-10, and IFNgamma profiles in uveitis.** *Investigative ophthalmology & visual science* 2006, **47**(1):272-277.

56. Ren Y, Vissink A: **Cytokines in crevicular fluid and orthodontic tooth movement.** *European journal of oral sciences* 2008, **116**(2):89-97.
57. Uematsu S, Mogi M, Deguchi T: **Interleukin (IL)-1 beta, IL-6, tumor necrosis factor-alpha, epidermal growth factor, and beta 2-microglobulin levels are elevated in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement.** *Journal of dental research* 1996, **75**(1):562-567.
58. Iwasaki LR, Gibson CS, Crouch LD, Marx DB, Pandey JP, Nickel JC: **Speed of tooth movement is related to stress and IL-1 gene polymorphisms.** *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics* 2006, **130**(6):691-699.
59. Polat O, Karaman AI: **Pain control during fixed orthodontic appliance therapy.** *The Angle orthodontist* 2005, **75**(2):214-219.

An abstract painting featuring vertical stripes of various colors including blue, green, red, and white. The stripes are of varying widths and are set against a background of lighter, textured brushstrokes. The overall effect is a vibrant, multi-colored composition.

Anexo

- IL-1 $\beta$ : Interleuquina 1- $\beta$ eta
- IL-6: Interleuquina 6
- IL-8: Interleuquina 8
- TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa
- M-CSF: Factor estimulante de colonias de monocitos/macrófagos
- G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos
- GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
- CRP: Proteína C reactiva
- OPG: Osteoprotegerina
- TRH: Hormona liberadora de tirotropina
- PBS: Tampón fosfato salino
- NTx: Telopéptido N-terminal del colágeno tipo I
- EFG: factor de crecimiento epidérmico
- TGF $\beta$ : receptores del factor de crecimiento transformante  $\beta$
- FGF: factor de crecimiento de fibroblastos
- NF- $\kappa$ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
- RANKL: ligando de receptor activador para el factor nuclear kappa B
- IFN $\gamma$ : Interferon gamma
- PGE<sub>2</sub> : prostaglandina E2
- PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas
- GCF: fluido gingival crevicular

- PAMPs: patrón molecular asociadas a patógenos

- DAMPs: patrón molecular asociadas a daños
- LPS: lipopolisacáridos
- ATP: Adenosín trifosfato
- TLRs: receptores tipo Toll
- NLR: Receptores tipo NOD (dominio de oligomerización por unión de nucleótidos que contiene la proteína 2)
- PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- MeOH: metanol
- dH<sub>2</sub>O: agua destilada
- SAPE: acrónimo del inglés Streptavidin, R-Phycoerythrin Conjugate
- DEE: dolor espontáneo en el diente experimental
- DEC : dolor espontáneo en el diente control
- DME : dolor en el diente experimental al morder un rollo de algodón
- DMC : dolor en el diente control al morder un rollo de algodón
- ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
- d : días
- h: horas
- IC: intervalo de confianza
- ICLI: intervalo de confianza límite inferior
- ICLS: intervalo de confianza límite superior
- Dif: diferencias